

Induktion einer T_H1 –Reaktion nach Stimulation von dendritischen Zellen mit MALP–2 und IFN– γ in einem *in* *vitro* Allergiemodell

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
DR. RER. NAT.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. biol. Henning Weigt
geboren am 25.05.1974 in Hameln

2003

Referent: PD Dr. Andreas Emmendorffer
Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller
Tag der Promotion: 12.06.2003

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von dendritischen Zellen (DC) auf die allergische T_H2 -Reaktion untersucht. Dazu wurde zunächst die Generierung von humanen DC aus Monozyten etabliert und optimiert. Monozyten wurden aus dem Vollblut von freiwilligen gesunden Blutspendern mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender magnetischer Zellsortierung (MACS) in hoher Reinheit (97%) isoliert. In einer 7-tägigen Zellkulturphase entstanden aus den Monozyten durch die Zugabe von GM-CSF und IL-4 unreife DC. Diese waren durch eine hohe Endozytosefähigkeit und eine schwache Expression von CD 80 und CD 86 sowie ein Fehlen von CD 83 gekennzeichnet.

Dieses Protokoll wurde angewendet, um DC von Spendern, die gegen das Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, DerP1, allergisch sind, bzw. von gesunden Kontrollspendern zu generieren. Zur funktionellen Charakterisierung wurden diese DC anschließend mit autologen Lymphozyten kokultiviert. In diesem *in vitro* Allergiemodell stellte sich nach DerP1 Vorstimulation in der Allergiker-Gruppe eine T_H2 Reaktion ein. Diese war durch die gesteigerte Produktion des T_H2 -Zytokins IL-4 und die reduzierte Produktion des T_H1 -Zytokins IFN- γ durch die Lymphozyten gekennzeichnet. In der gesunden Kontrollgruppe hatte die Allergenstimulation keinen Effekt. Mit diesem Modell kann die Beeinflussung des lymphozyten-modulatorischen Potenzials von DC durch pharmakologische Kandidatensubstanzen untersucht werden.

Als Kandidatensubstanz wurden DC von Allergikern mit 100 pg/ml MALP-2, einem synthetischen Lipopeptid abgeleitet aus *Mycoplasma fermentans*, und mit 500 U/ml IFN- γ sowie dem Allergen stimuliert. Diese Stimulation induzierte die Reifung von DC: Die Expression von CD 80, CD 83 und CD 86 sowie CD 40 und HLA-DR wurde hochreguliert, der Monozyten-Marker CD 14 herunterreguliert. Des Weiteren induzierte die Gabe beider Substanzen die Ausschüttung der Zytokine IL-12 und TNF- α . In der Kokultur von DC mit autologen Lymphozyten wurde durch diese Behandlung die allergenspezifische T_H2 -Reaktion in eine T_H1 -Reaktion überführt: Die IFN- γ Ausschüttung wurde massiv gesteigert, was mit der Reduktion der IL-4 Konzentration einher ging. Des Weiteren induzierten mit MALP-2 und IFN- γ sowie Allergen vorbehandelte DC die lymphozytäre Proliferation.

Diese Effekte waren von der Produktion von IL-12 abhängig, da die Blockierung dieses Zytokins in der Kokultur durch Antikörper die lymphozytäre IFN- γ Produktion und die Proliferation reduzierte.

Die hier beschriebene Modulation der allergischen T_H2-Reaktion nach T_H1 durch MALP-2 und IFN- γ stimulierte DC stellt eine Rationale für die Applikation von DC in der Allergietherapie dar.

Schlagworte

dendritische Zellen, Allergie, MALP-2

Abstract

It was the aim of this study to analyze the influence of dendritic cells (DC) on the allergic T_H2-reaction. Therefore, the generation of human DC from monocytes was initially established and optimized. Monocytes were isolated to high purity (97%) by density gradient centrifugation and subsequent magnetic cell sorting (MACS) from the blood of healthy donors. During a 7-day cell culture period, monocytes developed to immature DC by adding 800 U/ml GM-CSF and 500 U/ml IL-3. These were characterized by a high endocytotic capacity and a weak expression of CD 80 and CD86 as well as a lack of CD 83.

This protocol was used to generate DC from donors allergic to the major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (DerP1) and respectively from non-allergic control subjects. For functional characterization, these cells were incubated with autologous lymphocytes. In this *in vitro* allergy model, a T_H2 response developed in the allergics-group after prestimulation with DerP1. It was characterized by an enhanced production of the T_H2-cytokine IL-4 and a reduced production of the T_H1-cytokine IFN- γ by the lymphocytes. Allergen stimulation had no effect on the healthy control group. This model is suited to examine the effect of drug candidates on the potential of DC to modulate lymphocyte function.

DC were stimulated with 100 pg/ml of the drug candidate MALP-2, a synthetic lipopeptide derived from *Mycoplasma fermentans*, and with 500 U/ml IFN- γ as well as the allergen. Stimulation induced the maturation of DC: expression of CD 40, CD 80, CD 83, CD 86 and HLA-DR was upregulated, while the monocyte marker CD 14 was downregulated. Furthermore, addition of both substances induced the release of the cytokines IL-12 and TNF- α . In the coculture of DC and autologous lymphocytes, the allergen specific T_H2 reaction was modulated towards T_H1 by the stimulation: while the IFN- γ release was massively increased, IL-4 production was reduced. Furthermore, MALP-2 and IFN- γ plus DerP1 prestimulated DC induced lymphocyte proliferation.

These effects depended on the production of IL-12, as inhibiting this cytokine in the coculture with an antibody reduced IFN- γ production and proliferation.

The here described modulation of an allergic T_H2–reaction to T_H1 by MALP–2 and IFN– γ treated DC gives a rationale for applying DC in the therapy of allergic disorders.

Keywords

dendritic cells, allergy, MALP-2

Inhaltsverzeichnis

KURZZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	11
1.1 DENDRITISCHE ZELLEN	11
1.1.1 Dendritische Zellen <i>in vivo</i>	11
1.1.2 Dendritische Zellen <i>in vitro</i>	14
1.2 DIE ALLERGISCHE REAKTION	16
1.3 MALP-2 UND IFN- γ	17
1.3.1 MALP-2	17
1.3.2 IFN- γ	18
1.4 ZIELE DER ARBEIT	18
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 HERSTELLERVERZEICHNIS	20
2.2 CHEMIKALIEN	21
2.3 EINWEGMATERIALIEN	22
2.4 GERÄTE	22
2.5 PUFFER UND MEDIEN	23
2.5.1 Puffer	23
2.5.2 Medien	24
2.6 ZYTOKINE UND STIMULANTIEN	24
2.7 ANTIKÖRPER	25
2.8 BLUTSPENDER	26
2.8.1 Blutbank	26
2.8.2 Allergiker	26
2.8.3 Nicht-Allergiker	26
2.9 ETHIK	27
2.10 AUFREINIGUNG VON ZELLEN UND GENERIERUNG VON DC	27
2.10.1 Dichtegradientenzentrifugation	27
2.10.2 Paramagnetische Separation	29
2.10.3 Kryokonservierung von Lymphozyten	29
2.10.4 Generierung von DC aus Monozyten	30
2.10.5 Stimulierung	30
2.10.6 Ernte	31
2.11 KOKULTIVIERUNG VON DC UND LYMPHOZYTEN	32
2.12 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
2.13 ELISA	35
2.14 PROLIFERATION	36
2.15 MIKROSKOPIE	36
2.16 ELISPOT	37
2.17 IL-12 BLOCKIERUNG	38
2.18 AUSWASCHUNG VON STIMULANTIEN	38
2.19 STATISTIK	39
3 ERGEBNISSE	40

3.1	GENERIERUNG VON IDC	40
3.1.1	Aufreinigung von Monozyten	40
3.1.2	Generierung von DC aus Monozyten.....	42
3.1.3	Überprüfung der Endozytosefähigkeit von iDC	44
3.2	ETABLIERUNG DES T _H 2-MODELLS	46
3.3	EINFLUSS DER STIMULATION MIT MALP-2 UND IFN- γ AUF DIE T _H 2 REAKTION	48
3.3.1	MALP-2 und IFN- γ induzieren synergistisch Reifungs- und Aktivierungsmarker von DC	48
3.3.2	Die Induktion von IL-12 durch Stimulation mit MALP-2 und IFN- γ geht mit der Reduktion von IL-10 einher	56
3.3.3	MALP-2 und IFN- γ verstärken synergistisch die allergenabhängige Proliferation	59
3.3.4	Die kombinierte Vorbehandlung von DC mit MALP-2 und IFN- γ moduliert die bestehende T _H 2 Immunreaktion nach T _H 1	62
3.4	DIE GESTEIGERTE PRODUKTION AN IFN- γ GEHT MIT EINER ERHÖHTEN FREQUENZ AN IFN- γ PRODUZIERENDEN ZELLEN EINHER.....	65
3.5	DER IFN- γ UND PROLIFERATION INDUZIERENDE EFFEKT IST IL-12 ABHÄNGIG	66
3.6	ALLERGEGEPULSTE, MIT MALP-2 UND IFN- γ AUSGEREIFTE DC SIND GEGEN EINE 4-TÄGIGE STIMULANTIENAUSWASCHPHASE RESISTENT	68
4	DISKUSSION	72
4.1	ISOLIERUNG VON MONOZYTEN UND GENERIERUNG VON DC	73
4.2	DAS <i>IN VITRO</i> ALLERGIEMODELL	75
4.3	STIMULATION MIT MALP-2 UND IFN- γ	76
4.3.1	Einfluss der Stimulation auf DC	76
4.3.2	Effekt von mit MALP-2 und IFN- γ vorstimulierten DC auf autologe Lymphozyten in der Kokultur	77
4.3.3	Blockierung von IL-12 in der Kokultur	79
4.3.4	Auswaschung von Stimulantien	80
4.4	AUSBLICK	81
5	LITERATURVERZEICHNIS	82
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	93
7	TABELLENVERZEICHNIS	93
8	PUBLIKATIONSLISTE.....	94
9	ERKLÄRUNG.....	96
10	DANKSAGUNG	97
11	LEBENS LAUF	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: Antigen Presenting Cell)
CD	Differenzierungscluster (engl.: Cluster of Differentiation)
Ci	Curie
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (engl.: Confocal Laserscanning Microscopy)
CPM	Zählungen pro Minute (engl.: Counts Per Minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
DC	dendritische Zellen (engl.: Dendritic Cells)
DerP1	Majorallergen der Hausstaubmilbe <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	Enzymgekoppelte Immunabsorptionsbestimmung (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
ELISpot	Enzyme-linked Immunospot Assay
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (engl.: Fluorescence Activated Cell Scanning)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: Forward Scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie Stimulierender Faktor
iDC	Unreife DC (engl.: Immature DC)
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molarität
m	Mol
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl.: Magnetic Cell Sorting)
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid, 2kDa
mDC	Reife DC (engl.: Mature DC)

mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
ml	Milliliter
myDC	Myeloide DC
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanomol
PAMP	Pathogen-assoziiertes Molekulares Muster (engl.: Pathogen-Associated Molecular Pattern)
PARRP	Mustererkennungsrezeptor (engl.: Pattern Recognition Receptor)
PBMC	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cells)
pDC	Plasmacytoide DC
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: Side Scatter)
T _H 0	T-Helferzelle Typ 0
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
T _H N	Naive T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: Toll-like Receptor)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Einheiten (engl.: Units)
UpM	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

1.1.1 Dendritische Zellen *in vivo*

Der menschliche Körper ist einem ständigen Angriff von Pathogenen und Fremdstoffen ausgesetzt. Sie können über Organe, die einen intensiven Kontakt zur Außenwelt haben, wie die Haut, die Lunge oder der Verdauungstrakt, in den Körper gelangen. Um sich mit diesen potenziell gefährlichen Organismen und Substanzen (im weiteren: Antigen) auseinander zu setzen, verfügt der Körper über ein hoch spezialisiertes Netzwerk, das Immunsystem. Zu diesem System gehören u.a. die Leukozyten, die weißen Zellen des Blutes. Sie stammen alle von hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche als CD 34-positive Zellen im Knochenmark zu finden sind, ab und differenzieren im Laufe ihrer Entwicklung zu Effektorzellen. Zu den Effektoren der Immunität gehören u.a. Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Granulozyten, NK-Zellen und Lymphozyten (T- und B-Zellen).

Den ersten Kontakt zu eingedrungenen Pathogenen und Substanzen nehmen die antigenpräsentierenden Zellen, also B-Zellen, Makrophagen und DC, auf. Hierbei kommt den DC eine besondere Bedeutung zu, da sie als einzige naive T-Zellen, welche noch keinen Antigenkontakt hatten, aktivieren können (priming). DC werden deshalb als professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichnet (Havenith, Breedijk et al., 1993; Inaba, Metlay et al., 1990a; Inaba, Metlay et al., 1990b; Liu and MacPherson, 1993). Im unreifen Zustand liegen DC als interdigitierende Zellen in den Organen vor. Interdigitierende DC der Haut werden nach ihrem Entdecker auch Langerhanssche Zellen genannt (Hoefsmit, 1982; Stingl, 1990). Unreife DC (engl.: immature DC, iDC) sammeln an der Schnittstelle zwischen Umwelt und Körper Antigen. Dazu sind sie mit der Fähigkeit zur Substanzaufnahme, das heißt Phagozytose und Pinozytose, ausgestattet (Guermonprez, Valladeau et al., 2002; Thery and Amigorena, 2001). iDC besitzen Anordnungen von Rezeptoren, mit denen sie Antigen erkennen können. Mittels dieser Rezeptoren sind DC in der Lage, Antigene aufgrund deren molekularer Struktur zu differenzieren. Dabei wird die antigenspezifische Struktur als pathogen-assoziiertes molekulares Muster (engl.: Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP), die Rezeptoren entsprechend als

Mustererkennungsrezeptoren (engl.: Pattern–Recognition Receptor, PARRP) bezeichnet. Zu den PARRP gehören die Toll–like–Rezeptor Familie (TLR), der Mannose–Rezeptor, die Fc–Rezeptoren, der Lektin–Rezeptor und andere. Zum Beispiel wird bakterielle, CpG methylierte DNA von TLR–9 erkannt, bakterielles Lipopolysaccharid von TLR–4, bakterielles Flagellin von TLR–5, virale (doppelsträngige) RNA von TLR–3 (Akira, Takeda et al., 2001; Barton and Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2001; Medzhitov, Preston-Hurlburt et al., 1997). Bindung dieser Rezeptoren, ebenso wie ein proinflammatorisches Mikromilieu, induzieren die Reifung von DC (Koski, Lyakh et al., 2001). Während der Reifung wechseln DC von einem antigen–aufnehmenden zu einem antigen–präsentierenden Zelltyp. Die Fähigkeit zur Phago– und Pinozytose nimmt ab, die entsprechenden Rezeptoren werden herunterreguliert. Statt dessen wird das zuvor aufgenommene Antigen nach intrazellulärer Prozessierung über Moleküle des MHC–Komplexes an die Zelloberfläche gebracht und präsentiert (Austyn, 1996; Granucci, Ferrero et al., 1999).

Die bisher beschriebenen Vorgänge wurden früher dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Um die nächste Ebene des Immunsystems, das angepasste Immunsystem, zu aktivieren, nehmen DC Kontakt zu T–Zellen auf. Diese befinden sich in den lymphatischen Organen wie den Lymphknoten und der Milz. In diesen Organen werden konstitutiv chemotaktische Faktoren, Chemokine (z.B. SLC/CCL21), sezerniert. Um die Organe zu finden, geht die Reifung der DC mit der Expression von Rezeptoren für diese Chemokine (z.B. CCR–7) einher. Nachdem reife DC (engl.: Mature DC, mDC) die peripheren Organe verlassen haben, werden sie passiv in der Lymphflüssigkeit zu den lymphatischen Organen transportiert. Anhand des dort vorhandenen Chemokingradienten wandern sie in die T–Zell Bereiche der Organe (Ansel, Ngo et al., 2000; Chan, Kothakota et al., 1999; Dieu-Nosjean, Vicari et al., 1999; Forster, Schubel et al., 1999). Dort bilden sie astartige Verzweigungen aus, mit denen sie direkten Zell–Zell Kontakt zu T–Zellen aufnehmen. Aufgrund dieser Morphologie haben DC ihren Namen erhalten (gr.: dendros, der Baum).

Des Weiteren schütten die mDC Zytokine aus (z.B. IL–10, IL–12) und exprimieren kostimulatorische Oberflächenmoleküle (z.B. CD 80, CD 86), die die Funktion von

T-Zellen beeinflussen. Das Zytokin- und Oberflächenmolekülmuster ist nun das Resultat der Wirkung der PAMP bzw. des Mikromilieus, in dem die Reifung von DC induziert wurde (Akira, Takeda et al., 2001; Barton and Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2001). Hat eine T-Zelle das MHC-präsentierte Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkannt, wird sie in ihrer Funktion entsprechend modifiziert.

Beispielsweise induzieren intrazelluläre bakterielle Infektionen eine T-Helfer (T_H)1 Immunantwort. Die gebildeten T_H 1 Zellen sind durch die Produktion des Zytokins $IFN-\gamma$ gekennzeichnet. Effektormechanismen der T_H 1-Reaktion sind primär die Aktivierung der zellulären Komponenten des Immunsystems, der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten, sowie die Bildung von Ig2a-Antikörpern durch aktivierte Plasmazellen. Infektionen durch Parasiten wie z.B. die Eier des Helminthen *Schistosoma mannsionii* führen zu einer T_H 2-Immunantwort. Sie ist gekennzeichnet durch die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-5. Diese bewirken die Bildung von Antikörpern des Isotyps IgE und die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Daneben können unpolarisierte T-Helferzell-Antworten, T_H 0, induziert werden (Kalinski, Hilkins et al., 1999; Kalinski, Schuitemaker et al., 1999). Unter bestimmten Bedingungen schalten DC auch T-Zell Funktionen ab, das Resultat ist die antigenspezifische Toleranz. Dieser Mechanismus findet im Rahmen der T-Zell-Reifung im Thymus statt: Bei der Negativselektion werden autoreaktive T-Zellen, die von DC präsentierte Selbstantigen erkennen, deletiert. Ein weiterer Mechanismus der Toleranzinduktion ist die periphere Toleranz. Hier werden T-Zellen, die die Thymusselektion durchlaufen haben, in den Organen des Körpers abgeschaltet (Huang and MacPherson, 2001).

Die Mechanismen dieser T-Zell Modifikationen sind die Affinität und Dauer der MHC – T-Zell-Rezeptor Interaktion sowie, wie oben beschrieben, das Expressionsmuster von Zytokinen und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen (Kalinski, Hilkins et al., 1999). Die Eigenschaft von DC, die verschiedenen T-Zell Reaktionen auf der Basis der in der Körperperipherie erkannten und aufgenommenen Antigene zu steuern, wird als immunologische Plastizität bezeichnet (Huang, Liu et al., 2001; Lanzavecchia and Sallusto, 2001; Liu, Kanzler et al., 2001).

Nachdem DC ihre Aufgabe erfüllt haben, gehen sie durch Apoptose zugrunde. Dies ist einer der Mechanismen, durch den die Immunantwort zeitlich begrenzt wird (Santiago-Schwarz, 1999).

Es sind mehrere Subpopulationen von DC im Menschen bekannt. So lassen sich die so genannten plasmazytoiden DC (pDC) von myeloiden DC (myDC) u.a. durch die Ausstattung mit Oberflächenmolekülen unterscheiden. Während pDC z.B. die TLR –7 und –9 exprimieren, tragen myDC TLR –1, –2, –3, –4, –5, –6 und –8. Daraus ergeben sich unterschiedliche Funktionalitäten, da beide Zellen auf unterschiedliche Stimuli reagieren (Jarrossay, Napolitani et al., 2001; Kadowaki, Ho et al., 2001; Krug, Towarowski et al., 2001). Zum Beispiel sind pDC dafür bekannt, nach Stimulierung große Mengen an Typ-I – Interferonen zu produzieren, während myDC hauptsächlich IL–12 sezernieren. Die Ontogenie dieser Populationen sowie weiterer Subgruppen ist noch nicht vollständig geklärt.

1.1.2 Dendritische Zellen *in vitro*

Die Fähigkeit von DC, Antigen aufzunehmen, zu präsentieren und primäre Immunantworten zu induzieren, macht sie für therapeutische Anwendungen hoch interessant. Für die Tumorthherapie ist hierbei die Grundidee, DC *ex vivo* mit tumorrelevantem Antigen zu beladen, zu aktivieren und in den Körper zurückzugeben. Man erhofft sich, dass so eine Immunreaktion gegen den Tumor induziert wird. Voraussetzung für den Erfolg der Therapie ist, dass sich die Tumoren immunologisch von gesundem Gewebe unterscheiden lassen (Dermime, Armstrong et al., 2002). Ein Beispiel ist das Melanom, Nieren– und Prostatakarzinom (Engleman, 1996; Steinman, 1996). Hier wurden bereits verschiedene klinische Studien mit Tumorpatienten durchgeführt (Marten, Flieger et al., 2002; Smithers, O'Connell et al., 2003; Tjoa, Lodge et al., 1999). Eine weitere, bisher nur konzeptionell verwirklichte Applikation ist die Therapie von schwer zu beherrschenden bakteriellen Infektionen.

Allergische Erkrankungen sind im Gegensatz zu Tumoren nicht durch mangelnde Immunität, sondern durch eine fehlgeleitete Immunantwort gekennzeichnet. Bei

allergischen Reaktionen des Typ I induzieren DC eine T_H -2 Reaktion gegen das aufgenommene Allergen. Die oben beschriebenen Effektormechanismen, IgE-Synthese und Aktivierung eosinophiler Granulozyten, führen zu den typischen Allergiesymptomen. Des Weiteren ist die T_H -2 Reaktion verantwortlich für eine potenziell tödliche Erkrankung, das allergische Asthma bronchiale. Ziel einer DC-Applikation ist hier eine allergenspezifische Abschaltung (Anergie), beziehungsweise Hemmung der T_H 2-Antwort durch die Induktion einer antagonistischen T_H 1-Reaktion.

Bis vor wenigen Jahren war ein therapeutischer Einsatz von DC aufgrund ihrer zu geringen Anzahl im Körper nicht möglich. So sind weniger als 1% der Leukozyten des Blutes DC (McLellan, Starling et al., 1995). Abhilfe schafften Verfahren, mit denen eine ausreichende Anzahl an DC aus Vorläuferzellen generiert werden konnten. Heutzutage sind zwei verschiedene Vorläuferpopulationen bekannt.

Dies sind zum einen die bereits erwähnten CD 34 positiven hämatopoetischen Stammzellen. Mithilfe des Zytokins G-CSF können sie im Knochenmark mobilisiert werden und wandern daraufhin in das periphere Blut. Von dort können sie mittels Apherese isoliert werden. Die Stammzellen werden dann kultiviert und unter dem Einfluss der Zytokine GM-CSF und $TNF-\alpha$ entstehen innerhalb von 7–14 Tagen iDC (Caux, Dezutter-Dambuyant et al., 1992; Inaba, Inaba et al., 1992; Siena, Di Nicola et al., 1995). Der Nachteil des Verfahrens ist, dass die Mobilisierung der Stammzellen für den Patienten eine starke Belastung darstellt und dass die Apherese ein vergleichsweise kompliziertes Verfahren ist.

Die zweite Population an Vorläufern stellen die Monozyten des peripheren Blutes dar. Ca. 15% der Leukozyten sind Monozyten, sie können über eine einfache Vollblutentnahme und anschließende Aufreinigung in ausreichender Zahl gewonnen werden. Monozyten werden durch die Zytokine GM-CSF und IL-4 zu iDC, die Kulturdauer beträgt 5–7 Tage (Peters, Ruppert et al., 1991; Romani, Gruner et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Aufgrund der guten Verfügbarkeit von Monozyten ist diese Methode die im humanen System am häufigsten eingesetzte.

In vitro generierte DC stimmen in vielen Merkmalen mit *in vivo* DC überein. So haben beide im unreifen Zustand die Fähigkeit zur Endozytose, die sie im Laufe der Reifung verlieren. Auch sind die Stimuli, die die Reifung induzieren, vergleichbar. Wichtigste Eigenschaft für die therapeutische Anwendung ist die ebenfalls stark ausgeprägte Fähigkeit, nach entsprechender Stimulation T-Zellen zu primen und zur Proliferation anzuregen. Aufgrund des Expressionsmusters von TLR lassen sich aus Monozyten entstandene DC eher mit myDC vergleichen. Es darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei *in vitro* generierten DC um ein artifizielles System handelt. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass *in vivo* Monozyten zu DC werden. Außerdem ist das Mikromilieu der Zellkulturschale, in der DC entstehen, nicht mit der *in vivo* Situation vergleichbar. Dies ist von geringer Relevanz für therapeutische Zwecke, solange die Zellen die gewünschte Spezifikation, T-Zell Funktionen spezifisch zu regulieren, aufweisen. Die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus *in vitro* hergestellten DC auf das *in vivo* Geschehen ist jedoch nicht immer zweifelsfrei möglich.

1.2 Die allergische Reaktion

Typ-1 Allergien werden heutzutage als T_H2 -Immunreaktionen verstanden. Die immunologischen Kennzeichen sind die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 durch T_H2 -Zellen, nicht aber von $IFN-\gamma$ durch T_H1 -Zellen (Robinson, 2000). Diese Zytokine haben direkten Einfluss auf die Effektorphase der allergischen Reaktion. So fördern IL-4 und IL-13 die Bildung von IgE durch Plasmazellen. IgE bindet an eosinophile Granulozyten und Mastzellen, diese setzen nach Quervernetzung der Antikörper Mediatoren wie Histamin frei (Busse and Lemanske, Jr., 2001). Zudem fördert IL-5 die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten (Pauwels, Brusselle et al., 1997).

Die Konditionen, unter denen DC eine allergische Reaktion induzieren, sind nicht eindeutig geklärt. Einige Allergene, wie das Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, DerP1, führen durch immanente Eigenschaften zur T_H2 -Reaktion (Comoy, Pestel et al., 1998; Gough, Schulz et al., 1999). Zur Zeit ist das Fehlen von Infektionen und die keimreduzierte Lebensweise der „westlichen

Welt“ ein häufig zitiertes Konzept, um das vermehrte Auftreten von Allergien in diesen Ländern zu erklären. Dieses Konzept wird als Hygiene–Hypothese bezeichnet (Holla, Roy et al., 2002; Wills-Karp, Santeliz et al., 2001; Yazdanbakhsh, Kremsner et al., 2002). Der postulierte Mechanismus ist, dass ohne Stimulation durch bakterielle oder virale PAMP und andere „danger“ Signale das Immunsystem nicht mehr in Richtung T_H1 gedrängt wird und daher auf ungefährliche Substanzen wie Allergene mit einer T_H2 Antwort reagiert. Daher stellt die Stimulation des Immunsystems mit PAMP, wie z.B. MALP–2 und körpereigenen „danger“-Signalen wie $IFN-\gamma$ ein Konzept zur Balancierung des Immunsystems dar.

1.3 MALP–2 und $IFN-\gamma$

1.3.1 MALP–2

Das „makrophagen–aktivierende Lipopeptid, 2 kDa“ ist ein künstlich synthetisiertes Molekül, das ursprünglich aus einem Klon des Bakteriums *Mycoplasma fermentans* isoliert wurde. Es handelt sich um ein membranständiges, durch einen freien N–Terminus und daraus resultierend durch nur zwei Fettsäuren gekennzeichnetes Lipopeptid (Muhlradt, Kiess et al., 1997). MALP–2 ist ein PAMP, das über die TLR –2 und –6 u.a. auf humane Monozyten (Morr, Takeuchi et al., 2002; Takeuchi, Kaufmann et al., 2000) und auf Monozyten abgeleitete iDC wirkt (Weigt, Muhlradt et al., accepted). Die Stimulation von Monozyten mit MALP–2 bewirkt die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL–1, IL–6 und $TNF-\alpha$ sowie der von Prostaglandinen (Muhlradt and Schade, 1991). Für diese Wirkungen ist der freie N–Terminus von entscheidender Wichtigkeit, der nur aus 12 Aminosäuren bestehende Peptidanteil hat keinen Einfluss auf die Aktivität (Muhlradt, Kiess et al., 1997). MALP–2 wird von dem Gen *malp* kodiert. Ein weiteres Produkt dieses Gens ist MALP–404 bzw. M161Ag, ein 404 kDa umfassendes Lipoprotein der Zellwand. Parallel wurde von Calcutt et al. (Calcutt, Kim et al., 1999) und von Nishiguchi et al. (Nishiguchi, Matsumoto et al., 2001) entdeckt, dass MALP–2 die N–terminale Komponente von MALP–404 ist. Die erweiterte Aminosäuresequenz macht das Lipoprotein immunogen, außerdem hat es, im Gegensatz zu MALP–2, eine komplement–aktivierende Funktion.

1.3.2 IFN- γ

IFN- γ ist ein gut untersuchtes Zytokin, das primär von CD 4-positiven T_H1-Zellen, aber auch von CD 8-positiven zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert wird. Im Gegensatz zu den antiviral aktiven Typ-I – Interferonen ist die Hauptfunktion von IFN- γ die Makrophagenaktivierung sowie die Differenzierung von B-Zellen zu IgG2a produzierenden Plasmazellen. Damit kommt IFN- γ bei der Ausbildung der T_H1-Immunreaktion, für welche es auch ein Marker ist, eine besondere Rolle zu. Auf Monozyten und iDC hat es geringen Einfluss.

1.4 Ziele der Arbeit

Hauptziel der Arbeit ist die Vertiefung des Verständnis von der Biologie der Interaktion von monozyten-abgeleiteten DC mit Lymphozyten. Hieraus sollen neue Strategien zur Optimierung des therapeutischen Einsatzes von DC entwickelt werden. Im Vordergrund steht dabei die Induktion einer T_H1 Immunreaktion sowie grundlegende Untersuchungen, ob eine vorhandene T_H2-Reaktion durch Manipulation der DC in eine T_H1-Reaktion umgewandelt werden kann. Diese Reaktion ist bei der Behandlung von Allergien und Tumoren von besonderer Wichtigkeit.

Teilziele:

1. Etablierung der Methodik zur Gewinnung von aus Monozyten abgeleiteten DC. Dies beinhaltet eine Isolierungsmethodik für Monozyten aus Vollblut sowie die anschließende Zellkultur unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4. Optimierung der Methode hinsichtlich der Nutzbarmachung von DC für klinische Applikationen nach den Qualitätskriterien der guten Herstellungspraxis (engl.: Good Manufacturing Practice, GMP).
2. Etablierung eines Allergiemodells, in dem allergenbeladene DC von Allergikern mit autologen Lymphozyten kokultiviert werden.

3. Untersuchungen der Kandidatensubstanzen MALP-2 und IFN- γ auf ihr Potenzial, die allergische T_H2-Reaktion zu modulieren.

Diese Untersuchungen wurden in *in vitro* Experimenten durchgeführt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover für die Gewinnung von Monozyten aus dem Blut von Patienten mit Hausstaubmilbenallergie und aus gesunden Kontrollprobanden liegt unter Nr. 2707 vor.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellerverzeichnis

Acros	Geel, B
ALK-SCHERAX	Hamburg, D
Amersham	Braunschweig, D
BD Biosciences	Heidelberg, D
Beckmann Coulter	München, D
BioWhittaker	Verviers, B
Carl Zeiss	Jena, D
CellSystems	St. Katharinen, D
Corning	Wiesbaden, D
DRK Blutspendedienst	Springe, D
Dynatech	Deisendorf, D
Eltest	Bonn, D
Falcon	über BD Biosciences
Gibco	Eggenstein–Leopoldhafen, D
Greiner	Nürtingen, D
Heraeus	Osterode, D
Merck	Darmstadt, D
Miltenyi Biotech	Bergisch-Gladbach, D
Middendorff	Hannover, D
Molecular Probes	Leiden, N
Nunc	Wiesbaden-Biebrich, D
Orpegen	Heidelberg, D
Packard	Dreieich, D
R&D Systems	Wiesbaden, D
Roth	Karlsruhe, D
Sigma	München, D
Strathmann Biotech	Hamburg, D

2.2 Chemikalien

2-Propanol	Sigma
³ H-Thymidin	Amersham Pharmacia
7-AAD	Beckmann Coulter
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
DerP1	ALK-Scherax
Dextran-FITC	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
Humanes Serumalbumin (HSA)	DRK Blutspendedienst
Lysing Solution	Orpegen
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Sigma
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma
Octylglucosid	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin G	Sigma
Polyoxyethylensorbat-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
ProLong Antifade kit	Molecular Probes
Rotiszint	Roth

Salzsäure (HCL), 1N	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 2N	Roth
Streptomycin	Sigma
Sucrose	Sigma
Tetramethylbenzidin mit H ₂ O ₂ (TMB Quick)	Acros
Thymidin, Tritium markiert (³ H Thymidin)	Amersham
To-Pro-3-Iodid	Molecular Probes

2.3 Einwegmaterialien

50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner
5 ml Polypropylenröhrchen	Falcon
96-well Rundbodenmikrotiterplatten	Falcon
Blutentnahmebeutel	Eltest
ELISA-Platten	Nunc
Kryoröhrchen	Corning
Zellkulturschalen	Falcon
Zellschaber	Nunc

2.4 Geräte

Absaugvorrichtung	Filtermate 196	Packard
Brutschrank	Heracell	Heraeus
Durchflusszytometer	EPICS XL MCL	Beckmann-Coulter
ELISA-Reader	MRX	Dynatech
ELISA-Washer	MRW	Dynatech
konfokales Mikroskop	LSM 510 META	Carl Zeiss
MACS	MidiMACS	Miltenyi Biotech
Szintillationsmessgerät	TopCount NXT	Packard
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus

2.5 Puffer und Medien

2.5.1 Puffer

- PBS
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung wurde gebrauchsfertig von BioWhittaker bezogen
- Separationspuffer
Oben genannter PBS wurden 0,5% HSA und 2 mM EDTA zugegeben
- ELISA Karbonatpuffer
17,3 g NaHCO_3
8,6 g Na_2CO_3
aq. bidest ad 1l
- ELISA Waschpuffer
0,05% Tween20 in PBS
- ELISA Blockierungspuffer
1% BSA
5% Sucrose
0,05% NaN_3
in PBS
- ELISA Verdünnungspuffer
1% BSA
0,01% NaN_3
in PBS
- FACS Puffer
2% FCS
0,02% NaN_3
in PBS

2.5.2 Medien

- AIM-V + P/S

AIM-V wurde von Gibco bezogen. Dem Medium wurden 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

- CellGroDC + P/S

CellGroDC wurde von CellSystems bezogen. Dem Medium wurden 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

- XVIVO 15 + P/S (XVIVO15)

XVIVO 15 wurde von BioWhittaker bezogen. Dem Medium wurden 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

- Einfriermedium

FCS + 10% DMSO

2.6 Zytokine und Stimulantien

- GM-CSF

GM-CSF wurde von Strathmann Biotech bezogen. Es wurde mit 800 U/µl in PBS + 0,5% HSA aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- IL-4

GM-CSF wurde von Strathmann Biotech bezogen. Es wurde mit 500 U/µl in PBS + 0,5% HSA aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- IFN-γ

GM-CSF wurde von Strathmann Biotech bezogen. Es wurde mit 1000 U/µl in PBS + 0,5% HSA aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- MALP-2

LPS-freies MALP-2 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. P.F. Mührladt, GBF Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Es wurden Stocklösungen von 1 mg/ml in 30% 2-Propanol in Wasser erstellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Eine erste Verdünnung (1:100) für die Arbeitslösung wurde in 25 µM Octylglucosid in PBS + 1% HSA erstellt, weitere Verdünnungen (1:100 der vorgenannten Verdünnung) in PBS. Die verdünnten Arbeitslösungen wurden bei +4°C gelagert.

- *Dermatophagoides pteronyssinus* Major Allergen 1 (DerP1)

DerP1 wurde von ALK-Scherax bezogen. Die Substanz wurde herstellerseits mittels Affinitätschromatographie aus Milbenextrakt aufgereinigt, sie ist enzymatisch inaktiv. Es wurde mit 5 mg/ml in PBS + 1% HSA aliquotiert und bei +4°C gelagert. Aufgenommene Substanz wurde für maximal 4 Wochen benutzt.

2.7 Antikörper

Antigen	Klon	Markierung	Hersteller
CD 14	murines IgG2a	PE	BD Biosciences
CD 14	murines IgG2a	FITC	Beckmann Coulter
CD 14	murines IgG2a	superparamagnetisch (MACS)	Miltenyi Biotec
CD 1a	murines IgG1	FITC	BD Biosciences
CD 40	murines IgG2a	PE	BD Biosciences
CD 80	murines IgG1	FITC	BD Biosciences
CD 83	murines IgG1	FITC	BD Biosciences
CD 86	murines IgG1	FITC	BD Biosciences
HLA-DR	murines IgG2a	PE	BD Biosciences
Isotypkontrolle-IgG1	murines IgG1	FITC	BD Biosciences
Isotypkontrolle-IgG2a	murines IgG2a	PE	BD Biosciences
Anti-IL-12p70	murines IgG1	unmarkiert	R&D Systems

Tabelle 1: Verzeichnis der benutzten Antikörper

2.8 Blutspender

Allen freiwilligen Spendern wurde nach Standardmethoden 500 ml venöses Vollblut abgenommen. Als Stabilisatoren waren in den Blutentnahmebeutel Citrat, Phosphat, Dextrose und Adenin herstellerseits vorgelegt.

2.8.1 Blutbank

Blut von gesunden, nicht auf Allergien getesteten Probanden wurde aus der Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen.

2.8.2 Allergiker

Die atopischen Probanden wurden aus der Probandenkartei der Abteilung "Klinische Asthma- und Inhalationsforschung" des Fraunhofer ITEM (Leitung: Prof. Dr. Norbert Krug) rekrutiert.

- Einschlusskriterien:
Positive Allergie-Anamnese (Heuschnupfen, Asthma, Neurodermitis)
Positiver Allergietest gegenüber *Dermatophagoides pteronyssinus* (DerP1)
Alter: 18 – 65
- Ausschlusskriterien:
Pathologische Laborparameter
Schwangerschaft bei Probandinnen
Teilnahme an anderen klinischen Studien

2.8.3 Nicht-Allergiker

Die gesunden Kontrollprobanden wurden durch Aushänge und Annoncen angeworben.

- Einschlusskriterien:
Negativer Allergietest
Keine Erkrankungen, keine Medikamente
Alter: 18 – 65
- Ausschlusskriterien:
Pathologische Laborparameter
Schwangerschaft bei Probandinnen
Teilnahme an anderen klinischen Studien

2.9 Ethik

Für die Rekrutierung der Allergiker (s. 2.6.2) und Nicht-Allergiker (s. 2.6.3) wurde das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover eingeholt. Die Kommission hatte keine Einwände gegen die Durchführung der Studie, sie wurde unter Nr. 2707 genehmigt.

2.10 Aufreinigung von Zellen und Generierung von DC

Humane DC wurden *in vitro* aus Monozyten des peripheren Blutes unter Zusatz geeigneter Wachstumsfaktoren generiert. Dazu wurden zunächst die PBMC (engl.: peripheral blood mononuclear cells), Monozyten und Lymphozyten, über eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Danach konnten die Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, engl.: magnetic cell sorting) über das monozytenspezifische Oberflächenmolekül CD 14 aufgereinigt werden.

2.10.1 Dichtegradientenzentrifugation

- Prinzip:
Um PBMC zu gewinnen wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierbei wurden die Blutzellen nach ihrer Dichte getrennt: Das Blut wurde über das Ficoll-Trennmedium geschichtet (Abb. 1a). Während

Granulozyten und Erythrozyten eine höhere Dichte als das Trennmedium ($\rho = 1,077 \text{ kg/l}$) besaßen und während der Zentrifugation am Boden eines Röhrchens pelletierten, sammelten sich PBMC an der Phasengrenzschicht von Plasma und Trennmedium und konnten dort abgesammelt werden. (Abb. 1b).

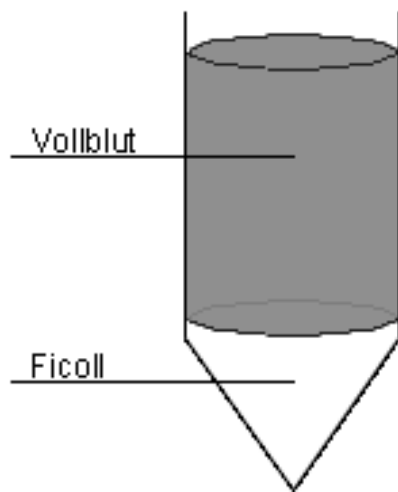


Abb. 1a: Ficoll-Paque
Dichtegradient vor Zentrifugation

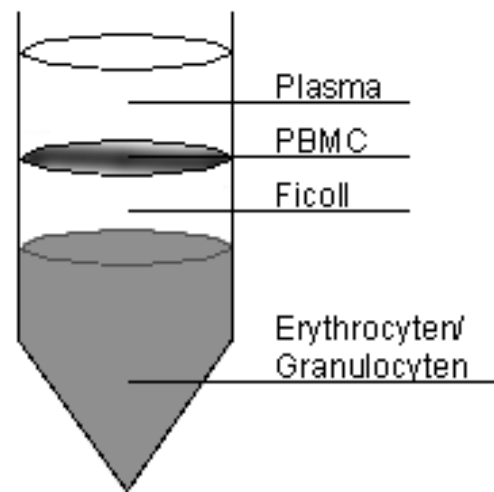


Abb. 1b: Ficoll-Paque
Dichtegradient nach Zentrifugation

- Durchführung

Zur Vorbereitung wurde das Vollblut bei 950 UpM für 15 min in 50 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus Plasma und Thrombozyten, wurde abpipettiert, verworfen und im Verhältnis 1:1 durch Separationspuffer ersetzt. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml der Ficoll-Paque Lösung vorgelegt. Diese wurde mit 35 ml der Blut-Puffer Lösung überschichtet und für 20 min bei 2000 UpM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Phasengrenze zwischen der Ficoll-Lösung und dem Blutplasma erkennbar. Diese konnte abpipettiert und für die MACS-Separierung benutzt werden.

2.10.2 Paramagnetische Separation

- Prinzip

Die weitere Aufreinigung der PBMC erfolgte mittels des MACS – Systems. Das MACS–System zur Monozytenisolierung beruht auf Antikörpern, die an das Zelloberflächenmolekül CD 14 binden. Dieses ist nur auf Monozyten und nicht auf Lymphozyten exprimiert. Die Antikörper waren an superparamagnetische Partikel aus Eisenoxid gekoppelt. Nach Inkubation der Antikörper mit PBMC wurden die Zellen auf eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befand, gegeben. Dabei liefen die nicht markierten Zellen durch die Säule, die markierten, CD 14 tragenden Zellen wurden zurückgehalten. Nahm man die Säule aus dem Magnetfeld und spülte, wurden die zurückgehaltenen Zellen eluiert.

- Durchführung

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMC gewaschen und in 80 µl Separationspuffer/ 1×10^7 PBMC aufgenommen. 20 µl paramagnetische anti-CD 14–Antikörper/ 1×10^7 PBMC wurden dazugegeben und für zehn min inkubiert. Nach weiterem Waschen gab man die PBMC auf die sich im Magnetfeld befindende Säule und spülte 3–fach mit je 4 ml Separationspuffer. Die Waschflüssigkeit wurde gesammelt und die darin befindlichen CD 14–negativen Zellen (Lymphozyten) eingefroren (s. 2.10.3). Nach dem Waschen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und nochmals mit 5 ml Separationspuffer gespült. In dieser Fraktion wurden die CD 14–positiven Zellen (Monozyten) eluiert, gewaschen und in Kultur genommen. Die Zellfraktionen wurden durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft.

2.10.3 Kryokonservierung von Lymphozyten

- Prinzip

Die sich in der CD 14–negativen Fraktion befindlichen Lymphozyten wurden 7 Tage nach der Separation benötigt. Während dieser Zeit wurden die Zellen kryokonserviert.

- Durchführung

Die CD 14–negative Fraktion der MACS–Separation wurde mit Separationspuffer gewaschen und in Einfrierlösung mit einer Konzentration von 3×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Je 1 ml der Lösung wurde in 2 ml Kryoröhrchen pipettiert und diese in eine Styroporschachtel gestellt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren.

2.10.4 Generierung von DC aus Monozyten

- Prinzip

Unter dem Einfluss der Zytokine GM–CSF und IL–4 entstehen aus Monozyten DC.

- Durchführung

Nach der MACS–Separierung wurden Monozyten mit Separationspuffer gewaschen und in XVIVO–15 bzw. CellGroDC oder AIM–V zu einer Zellkonzentration von $1,5 \times 10^6$ Monozyten/ml aufgenommen. Der Zellsuspension wurden 800 U/ml GM–CSF und 500 U/ml IL–4 zugegeben. Je Zellkulturschale wurden 5 ml der Suspension eingegeben und im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 5 Tagen wurden wiederum die gleichen Konzentrationen der Zytokine zugegeben und für weitere 2 Tage inkubiert. Die so erhaltenen DC werden als unreife DC (immature DC, iDC) bezeichnet.

2.10.5 Stimulierung

- Prinzip

Durch die Zugabe von GM–CSF und IL–4 entstanden aus Monozyten unreife DC. Diese Zellen konnten durch verschiedene körpereigene (z.B. Zytokine) oder körperfremde Stimuli (z.B. PAMP), auch unter dem Einfluss von Antigen, stimuliert und so zu reifen DC werden.

- Durchführung

Nach 5 Tagen der Zellkultur wurde den Zellen nochmals GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) zugesetzt. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Stimulantien gegeben. Dazu wurden der Zellkultur jeweils 5 µl der Stimulantien Stocklösungen zugefügt. In der folgenden Tabelle sind die Untersuchungsgruppen dargestellt:

Gruppe	Stimulantien		
PBS	PBS		
DerP1	DerP1, 5 µg/ml		
MALP-2		MALP-2, 100 pg/ml	
DerP1+MALP-2	DerP1, 5 µg/ml	MALP-2, 100 pg/ml	
IFN-γ			IFN-γ, 500 U/ml
DerP1+IFN-γ	DerP1, 5 µg/ml		IFN-γ, 500 U/ml
MALP-2+IFN-γ		MALP-2, 100 pg/ml	IFN-γ, 500 U/ml
DerP1+MALP-2+IFN-γ	DerP1, 5 µg/ml	MALP-2, 100 pg/ml	IFN-γ, 500 U/ml

Tabelle 2: Untersuchungsgruppen

Die Konzentrationen für MALP-2 und IFN-γ wurden in Titrationsreihen ermittelt. Dabei wurde die Konzentration der jeweiligen Substanzen, die die höchste Expression der Oberflächenmoleküle CD 80 und CD 86 auf DC induzierte, für die weiteren Experimente benutzt. Die Konzentration von DerP1 wurde ebenfalls in Titrationsreihen festgelegt. Hier wurde die Konzentration gewählt, die in der Kokultur die stärkste Sekretion von IL-4 durch autologe Lymphozyten induzierte (Daten nicht gezeigt).

2.10.6 Ernte

- Prinzip

Nach 7-tägiger Zellkultur wurden die DC geerntet. Dazu entnahm man sie quantitativ aus den Zellkulturschalen, um sie den Analysemethoden zuzuführen.

- Durchführung

Mit einer Pipette wurden die Zellen aus den Zellkulturschalen herausgespült und mit dem Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1200 UpM wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Den Schalen wurde 5 ml kalte PBS zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die verbliebenen Zellen aus der Schale gekratzt und ebenfalls in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zellzählung wurden 2×10^6 DC für die Durchflusszytometrie benutzt, der Rest für die Kokultivierung mit autologen Lymphozyten.

2.11 Kokultivierung von DC und Lymphozyten

- Prinzip

Um den Einfluss von DC auf autologe Lymphozyten zu überprüfen, wurde eine Kokultur dieser Zellen durchgeführt. Dazu wurden DC in Titrationsreihen eingesetzt und eine konstante Anzahl an Lymphozyten zugegeben. In der Kokultur wurden die Proliferation sowie die Produktion lymphozytärer Zytokine bestimmt.

- Durchführung

DC wurden in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in XVIVO15 aufgenommen. 150 μl dieser Zellsuspension gab man in die erste Reihe einer 96-well Rundbodenmikrotiterplatte, in der in den Reihen 2–8 100 μl XVIVO15 vorgelegt worden waren. Mit 50 μl der Zellsuspension aus Reihe 1 wurde seriell in den Reihen 2–7 titriert, Reihe 8 blieb frei von DC. Anschließend wurden die kryokonservierten Lymphozyten aufgetaut, gewaschen und mit XVIVO 15 auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 100 μl dieser Zellsuspension wurden in jede Vertiefung der Rundbodenmikrotiterplatte gegeben. Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit wurden Überstände aus Reihe 1 abgenommen und bei -20°C eingefroren. Für ausgewählte Versuchsansätze wurde zu diesem Zeitpunkt die Frequenz IFN- γ produzierender Zellen mittels ELISpot bestimmt. An Tag 5 wurde die

Proliferation bestimmt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. In Abbildung 2 ist ein zeitlicher Verlauf des Versuchs dargestellt:

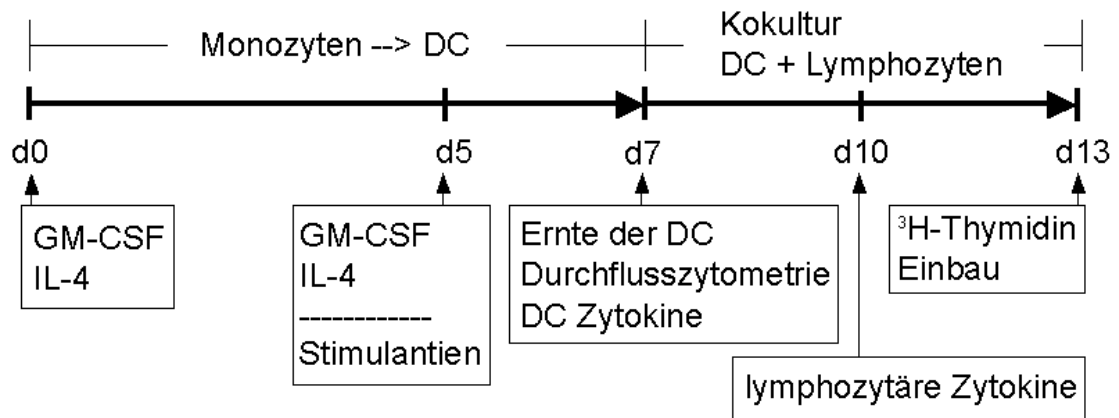


Abb. 2: Zeitstrahl der Versuchsdurchführung

2.12 Durchflusszytometrie

- Prinzip

Die Zellen wurden mit Antikörpern oder anderen Substanzen markiert. An die Antikörper oder Substanzen war ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden.

In der Durchflusszytometrie wurden einzelne Zellen aus einer Zellsuspension in Tröpfchenform durch einen Laserstrahl geleitet. Photomultiplikatoren maßen die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung korrelierte mit der Größe, die Seitwärts-Lichtstreuung mit der Granularität der Zellen. Neben diesen Parametern wurde die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz gemessen. Hier korrelierte die Stärke des emittierten Fluoreszenzlichtes mit der Anzahl der auf der Zelle vorhandenen markierten Struktur.

- Durchführung

2,5–5 x 10⁵ Zellen wurden in 5 ml Polypropylenröhrchen gegeben, gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Den Röhrchen wurden 20 µl der entsprechenden FITC- oder PE-markierten Antikörper oder 10 µl von 7-AAD, einem Vitalitätsfarbstoff, zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Röhrchen auf 500 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und im

Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der zugehörigen Systemsoftware. Für statistische Auswertungen wurde der Median der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen benutzt.

Mit der Durchflusszytometrie wurde zum einen der Erfolg der Monozytenseparation überprüft. Dabei wurden die PBMC, CD 14–negativen und CD 14–positiven Zellen jeweils mit anti–CD 14 Antikörpern markiert und die Anzahl der markierten Zellen in den jeweiligen Ansätzen bestimmt. Zum anderen untersuchte man die Expression bestimmter Oberflächenstrukturen und die Vitalität von DC nach der Ernte. Die Messungen für jeden Ansatz sind in Tabelle 3 angegeben.

Messung	Fluoreszenz 1	Fluoreszenz 2
Röhrchen 1	Isotypkontrolle FITC	Isotypkontrolle PE
Röhrchen 2	CD 83 FITC	7–AAD (Vitalität)
Röhrchen 3	CD 80 FITC	CD 40 PE
Röhrchen 4	CD 86 FITC	HLA–DR PE
Röhrchen 5	CD 1a FITC	CD 14 PE

Tabelle 3: Ansätze der durchflusszytometrischen Messung von geernteten DC

Des Weiteren wurde mit der Durchflusszytometrie die Frequenz endozytotisch aktiver Zellen gemessen. Dazu wurden 2×10^5 Zellen in einem Volumen von 90 μ l in Medium in 5 ml Polypropylenröhrchen gegeben. Dazu wurden 10 μ l FITC–markiertes Dextran (40 kDa) in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml pipettiert und für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Gleichbehandelte Kontrollansätze wurden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit PBS auf 4 ml aufgefüllt, bei 1200 UpM abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit Lysing Solution fixiert und anschließend gemessen. Mittels der EXPO–32 Zytometersoftware wurde durch gating der Anteil an FITC–Dextran positiven Zellen ermittelt. Zur qualitativen Beurteilung der Endozytose wurden gleichbehandelte Zellen mittels konfokaler Mikroskopie (s. 2.15) analysiert.

2.13 ELISA

- Prinzip

Mit ELISA (engl.: Enzyme-linked immunosorbent Assay)–Systemen können lösliche Substanzen durch eine antikörperbasierte Technik quantifiziert werden. Dabei war ein Antikörper auf den Boden einer Vertiefung einer entsprechenden Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wurde die zu messende Lösung inkubiert. Ein zweiter Antikörper band danach gegen die auf dem ersten Antikörper immobilisierte Substanz. Der zweite Antikörper war über ein Biotin–Streptavidin System an ein Enzym gekoppelt, das eine Farbreaktion umsetzen konnte. Der Grad der Farbentwicklung korrelierte dann mit dem Gehalt der antikörpergebundenen Substanz, dessen Konzentration gegen einen Standard bestimmt werden konnte. ELISA wurden zur Bestimmung von Zytokinen aus der DC–Kultur und aus der Kokultur von DC und autologen Lymphozyten eingesetzt.

- Durchführung

ELISA wurden mittels kommerziell erhältlicher kits (DuoSet, R&D Systems) nach Herstellerangaben durchgeführt: Ein erster polyklonaler Antikörper wurde in Karbonatpuffer über Nacht an die ELISA–Platte gecoatet. Nach dreimaligem Waschen (ELISA–washer) wurden Proben, Standards und Waschpuffer (Leerwert) für zwei h inkubiert. Nach wiederum drei Waschzyklen wurde ein monoklonaler, biotinylierter Antikörper für zwei h inkubiert, danach dreimal gewaschen. Das streptavidingekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase wurde anschließend für 20 min inkubiert. Nach einem letzte Waschschrift wurde das Farbsubstrat, TMB–Quick, zugegeben und für 15 min inkubiert. Danach wurde der Test durch Zugabe von 50µl/Vertiefung 2 N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bestimmt. Konzentrationen wurden mittels der Gerätesoftware anhand des Standards nach Leerwertabzug berechnet. Die jeweiligen Detektionslimits sind der Ergebnisdarstellung angefügt.

2.14 Proliferation

- Prinzip

Während der Proliferation von Zellen wurde zum Medium zugegebenes ^3H -Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Die eingebaute Radioaktivität konnte mittels Szintilationsmessung quantifiziert werden und diente als Maß für die Proliferation der Zellen. Die Proliferation wurde am Tag 6 der Kokultur gemessen.

- Durchführung

Am Tag 5 der Kokultur wurde in jede Vertiefung der 96-well Rundbodenmikrotiterplatte 10 μl ^3H -Thymidin entsprechend 5 $\mu\text{Ci/ml}$ gegeben. Nach 18-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen mit einer Absaugvorrichtung auf Filterplatten gebracht. Die Filterplatten wurden getrocknet, danach mit 25 μl Szintilationsflüssigkeit beschichtet und zugeklebt. Die Radioaktivität der DNA wurde im Szintilationsmessgerät quantifiziert. Für statistische Auswertungen wurden Szintilationsereignisse pro Minute (engl.: counts per minute, cpm) benutzt.

2.15 Mikroskopie

- Prinzip

Mittels konfokaler Mikroskopie (CLSM) wurde die Lokalisation von Dextran-FITC auf unreifen DC untersucht. Es sollte unterschieden werden, ob die Substanz auf der Oberfläche der Zellen adhärierte oder physiologisch aufgenommen wurde. Dazu wurden optische Schnitte durch die Zellen gelegt und die Lokalisation von Dextran-FITC in Relation zum Zellkern begutachtet.

- Durchführung

Unreife DC wurden wie unter 2.12 beschrieben mit FITC-Dextran inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 3% iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurde nach Waschen der Zellkern mit 2 nM

TO-PRO-3-Iodid gegengefärbt. Nach nochmaligem Waschen wurden die DC mit einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS aufgenommen, davon wurden 100 μl auf einen Objektträger pipettiert und die Flüssigkeit bei RT verdampfen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger mit ProLong Antifade Medium eingedeckt. Zur Analyse wurden die Präparate mit Laserlinien von 488 nm (für Dextran-FITC Fluoreszenz) und 633 nm (für TO-PRO-3-Iodid) angeregt. Das farbstoffspezifische Fluoreszenzlicht wurde auf verschiedenen Kanälen detektiert und mit der AIM Mikroskopsoftware dargestellt.

2.16 ELISpot

- Prinzip

Mittels ELISpot kann die Frequenz zytokin-produzierender Zellen bestimmt werden. Im Unterschied zum ELISA (s. 2.13) werden nicht Überstände auf einem primären Antikörper inkubiert, sondern Zellkulturen. Das von den Zellen abgegebene Zytokin wird dann direkt am Ort der Sekretion vom ersten Antikörper präzipitiert. Die Färbereaktion nach Inkubation mit einem enzymgekoppelten zweiten Antikörper erfolgt mit einem Farbstoff, der ebenfalls am Ort der Bildung ausfällt. So entstehen Farbstoffpunkte („Spots“), die bei optimaler Zellkonzentration spezifisch für eine zytokin-produzierende Zelle sind. ELISpots wurden zur Bestimmung der Frequenz $\text{IFN-}\gamma$ produzierender Zellen in der Kokultur von DC mit autologen Lymphozyten an ausgewählten Experimenten durchgeführt.

- Durchführung

ELISpot Versuche in der Kokultur von DC und autologen Lymphozyten wurden mittels kommerziell erhältlicher kits (BD ELISPOT, BD Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Kokultur wurde wie unter 2.11 beschrieben angesetzt. Nach 2-tägiger Inkubation wurden die Zellen der ausgewählten Versuchsansätze mittels einer Mehrkanalpipette aus der 96-well Rundbodenmikrotiterplatte entnommen und auf die ELISpot-Platte, welche mit einem ersten polyklonalen anti- $\text{IFN-}\gamma$ Antikörper vorgecoatet war, überführt und für weitere 24h im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 100%

Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand abgeschlagen, zweifach manuell mit demineralisiertem Wasser und dreifach mit Waschpuffer gewaschen. Ein biotinylierter monoklonaler anti-IFN- γ Antikörper wurde für zwei h zugegeben, danach dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Das streptavidin-gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase wurde anschließend für eine h inkubiert. Der Test wurde viermal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS gewaschen, anschließend das Farbsubstrat AEC für 30 min inkubiert. Durch Waschen mit demineralisiertem Wasser wurde abgestoppt. Die Anzahl zytokinproduzierender Zellen („spots“) wurde unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.17 IL-12 Blockierung

- Prinzip

Der Effekt von durch DC produziertem IL-12p70 auf das Verhalten von Lymphozyten sollte untersucht werden. Dazu wurde der Kokultur ein Antikörper, der IL-12p70 präzipitiert, zugegeben.

- Durchführung

Die Kokultur wurde, wie unter 2.9 beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich wurden direkt nach Pipettierung der Zellen 10 μ l eines IL-12p70 blockierenden Antikörpers in einer Endkonzentration von 3 μ g/ml zugegeben. Nach 3 Tagen wurde erneut die gleiche Konzentration des Antikörpers gegeben. Diese Versuche wurden mit 3 unabhängigen Blutspenden durchgeführt.

2.18 Auswaschung von Stimulantien

- Prinzip

Es sollte überprüft werden, ob die durchgeführten Stimulationen in der Lage sind, DC in einer Form zu arretieren, dass sie 4 Tage in stimulantienfreiem Medium überstehen, ohne in Phänotyp und Funktion verändert zu werden.

- Durchführung

DC wurden, wie unter 2.10.5 beschrieben, an Tag 5 stimuliert. Anstatt sie nach weiteren 48 h zu ernten, wurde zu diesem Zeitpunkt das Medium mit einer Pipette komplett abgenommen und durch stimulantienfreies, frisches Medium ersetzt. Nach 4-tägiger Inkubation wurden DC geerntet und entsprechend 2.11 in die Messsysteme und die Kokultur eingesetzt. Diese Versuche wurden mit 3 unabhängigen Blutspenden durchgeführt.

2.19 Statistik

Für statistische Auswertungen wurden, soweit nicht anders angegeben, 6 individuelle Experimente (unterschiedliche Spender) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte dieser Experimente, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Als Testverfahren wurde in Absprache mit der Abteilung Biostatistik der Medizinischen Hochschule Hannover der gepaarte Studentsche t-Test angewendet. Fehlerwahrscheinlichkeiten von $p \leq 0.05$ zwischen den verglichenen Gruppen wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von iDC

Humane DC können *in vitro* aus hämatopoetischen Stammzellen (Caux, Dezutter-Dambuyant et al., 1992; Inaba, Inaba et al., 1992; Siena, Di Nicola et al., 1995) des Knochenmarks oder aus Monozyten des peripheren Blutes (Peters, Ruppert et al., 1991; Romani, Gruner et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994) unter Zusatz geeigneter Wachstumsfaktoren generiert werden. Während eine große Anzahl an Monozyten aus peripherem Blut gewonnen werden kann, sind nur etwa 1% der Leukozyten des Blutes hämatopoetische Stammzellen (Bernhard, Disis et al., 1995; Meierhoff, Krause et al., 1998). Zur Gewinnung größerer Mengen an hämatopoetischen Stammzellen werden Patienten 3 bis 4 Tage mit dem Zytokin G-CSF (engl.: Granulocyte Colony Stimulating Factor) behandelt. Dadurch werden Stammzellen mobilisiert, aus dem Knochenmark ins Blut auszuwandern. Zur Gewinnung der Stammzellen wird im Anschluss eine Leukaphorese durchgeführt. Aufgrund der hohen Belastung für den Patienten und der aufwendigen Gewinnung der hämatopoetischen Stammzellen wurde die Generierung der DC aus Monozyten vorgenommen. Diese können durch die Entnahme von Vollblut in ausreichender Anzahl gewonnen werden.

3.1.1 Aufreinigung von Monozyten

Monozyten wurden, wie unter 2.10 beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender MACS-positiv-Selektion über das Oberflächenmolekül CD 14 isoliert. Die CD 14 – positiven Monozyten wurden für die Generierung von DC in Kultur genommen, während die CD 14 – negative Fraktion kryokonserviert wurde. Zur Überprüfung der Separation wurden PBMC nach der Dichtegradientenzentrifugation, CD 14 – positive und CD 14 – negative Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

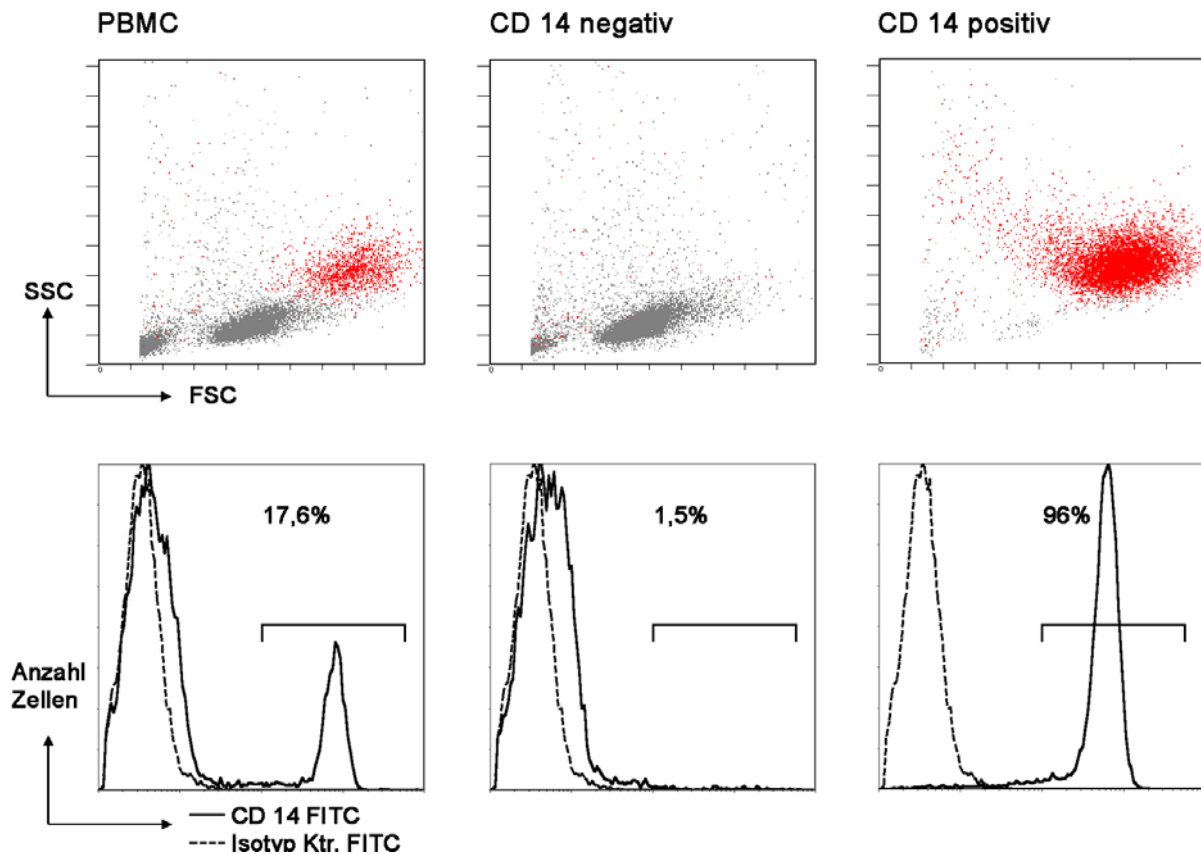


Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC, CD 14 – negativer und CD 14 – positiver Fraktion. Obere Reihe: vorwärts / seitwärts Streulichteigenschaften der Zellfraktionen. Untere Reihe, durchgehende Linie: Fluoreszenzprofil der Zellfraktionen nach der Färbung mit einem FITC-markiertem anti-CD 14 – Antikörper. Gestrichelte Linie: Fluoreszenzprofil nach Färbung mit einer entsprechenden Isotypkontrolle. Die Klammern geben den Prozentwert von CD 14 exprimierenden Zellen (Monozyten) an.

Während in den PBMC 17,6% Monozyten enthalten waren, ist dieser Anteil in der CD 14 – negativen Fraktion auf 1,5% reduziert worden. Die Monozyten sind in der CD 14 – positiven Fraktion enthalten, wo sie 96% der Gesamtzellen ausmachen (Abb. 3). Diese Werte entstammen einem typischen Experiment und waren höchst reproduzierbar (durchschnittlicher Anteil CD 14 – positiver Zellen in der CD 14 – positiven Fraktion: 97% \pm 1,5%). Mittels Dichtegradientenzentrifugation und MACS – Separation konnten Monozyten in hoher Reinheit isoliert werden. Die CD 14 – negativen Lymphozyten wurden für weitere Untersuchungen gewonnen.

3.1.2 Generierung von DC aus Monozyten

Monozyten reifen unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 in einem Zeitraum von 5 – 10 Tagen zu unreifen DC. Zur Ermittlung der optimalen Zeitpunkte und Konzentrationen wurden die Substanzen in seriellen Verdünnungen gegeneinander titriert. Als optimal wurde für GM-CSF eine Konzentration von 800 U/ml, für IL-4 eine Konzentration von 500 U/ml ermittelt. Diese Konzentrationen wurden der Zellkultur am Tag 0, dem Beginn der Kultur, und Tag 5 zugesetzt. Nach insgesamt 7-tägiger Zellkultur wurden die entstandenen DC geerntet. Diese Werte entsprechen den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen (Thurner, Roder et al., 1999).

Herkömmlichen Zellkulturmedien wird häufig fötales Kälberserum zugesetzt, um die Ausbeute und Vitalität von Zellen zu steigern. Zur therapeutischen Applikation darf diese xenogene Substanz aufgrund der Gefahr, eine anaphylaktische Immunreaktion dagegen zu induzieren (Mackensen, Drager et al., 2000), bzw. xenogene Infektionen zu übertragen (Asher, 1999; Rolleston, 1999), nicht benutzt werden. Daher wurden die Zellkulturmedien AIM-V, CellGro-DC und XVIVO-15, die für die Produktion therapeutisch anwendbarer DC zugelassen sind, getestet. Für die Analyse der Zellkulturmedien wurden die zuvor ermittelten Konzentrationen an GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) eingesetzt. Die aufgereinigten Monozyten wurden in den 3 aufgeführten Medien kultiviert. Zum Vergleich wurden die Parameter Zellzahl, Vitalität und Expression funktionell relevanter Oberflächenmoleküle der generierten DC nach Beendigung der Kultivierungsphase ermittelt.

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurden alle Zellen geerntet und ein Aliquot in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Ein weiteres Aliquot wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid inkubiert, um die Vitalität der Zellen zu bestimmen. Propidiumjodid ist ein Farbstoff, der nur in geschädigte Zellen eintreten kann und in die DNA interkaliert. Der Anteil an propidiumjodid-gefärbten, toten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der verschiedenen Medien einander gegenübergestellt.

Medium	AIM-V	CellGroDC	XVIVO-15
Zellzahl nach 7 Tagen in Prozent der eingesetzten Zahl	48%	30%	23%
Anteil vitaler Zellen in Prozent von Gesamtzellen	88%	90%	96%

Tabelle 4: Vergleich der Zellzahlen und der Zellvitalitäten.

Das Medium AIM-V lieferte die größte Ausbeute an DC mit akzeptabler Vitalität. Mit XVIVO-15 wurde nur knapp die Hälfte an DC, allerdings mit höherer Vitalität, geerntet, CellGroDC lag für die hier betrachteten Parameter zwischen den vorgenannten Medien.

Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde mittels Durchflusszytometrie durch die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die entsprechenden Moleküle bestimmt.

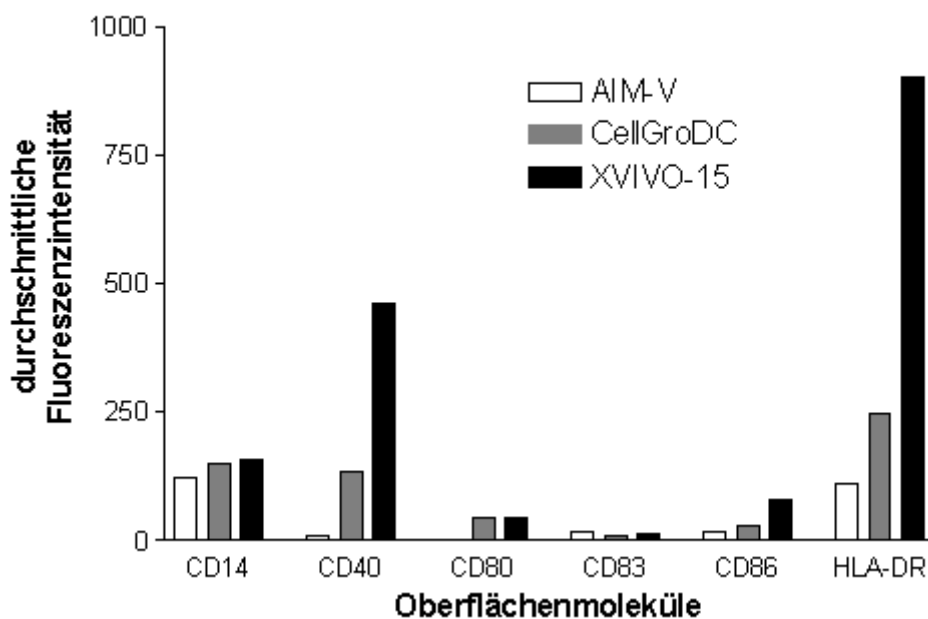


Abb. 4: Expression von funktionell relevanten Oberflächenmolekülen nach 7-tägiger Inkubation von Monozyten unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 in den angegebenen Medien. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Abzug der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle.

Zellen, die im AIM-V Medium generiert wurden, zeigten aufgrund der fehlenden CD80 sowie der geringen CD 40, CD86 und HLA-DR Expression nicht das

charakteristische Oberflächenmolekülmuster für unreife DC. Zellen, die in CellGro-DC-Medium bzw. in X VIVO-15-Medium inkubiert wurden, zeigten hingegen das für unreife DC typische Expressionsmuster an Oberflächenmarkern, wobei das XVIVO-15-Medium den stärksten Effekt induzierte (Abb. 4). Bei der Auswahl des geeigneten Mediums wurde die Funktionalität, gemessen als Ausstattung der Zellen mit funktionell relevanten Oberflächenmolekülen sowie die Vitalität als wichtigste Kriterien angesehen. Deshalb erwies sich das XVIVO-15-Medium als das am besten geeignete Medium. Es wurde in weiteren Untersuchungen eingesetzt.

3.1.3 Überprüfung der Endozytosefähigkeit von iDC

Zwingende Voraussetzung für die antigenspezifische Therapie mit DC ist, dass die DC das Antigen aufnehmen. Um dies zu überprüfen, wurden iDC nach 5-tägiger Zellkultur mit der Modells substanz Dextran inkubiert. Zum Nachweis wurde FITC-markiertes Dextran eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C gegen eine 0°C Kontrolle wurden die Zellen fixiert, der Zellkern gegengefärbt und mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie analysiert.

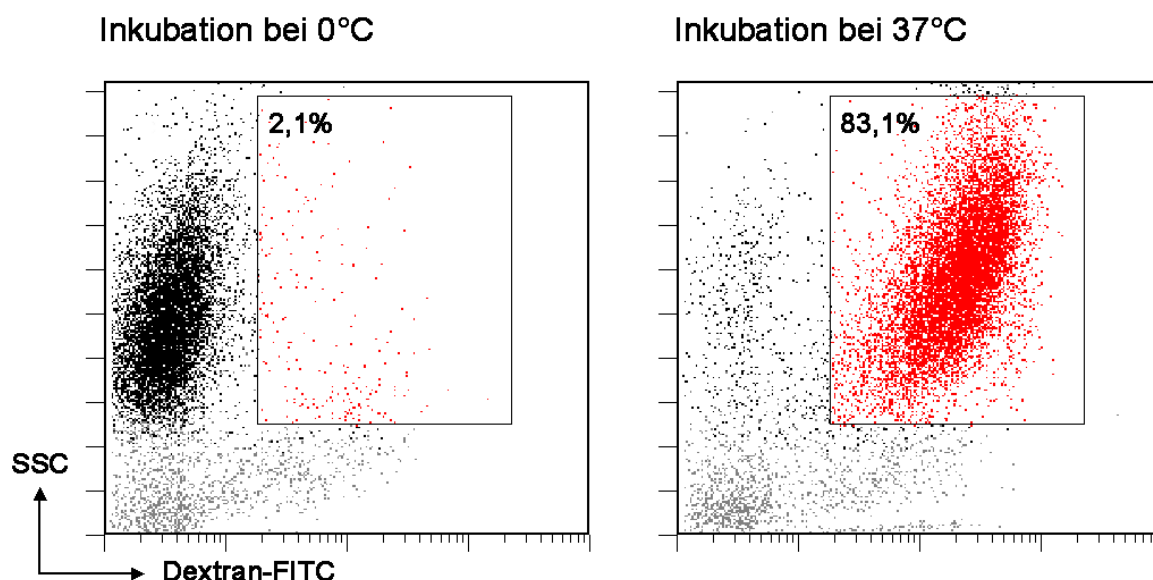


Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse von DC nach Dextran-FITC Inkubation bei 0°C (linkes Bild) bzw. bei 37°C. Dargestellt ist die Dextran-FITC Fluoreszenz (x-Achse) gegen das Seitwärtsstreulicht.

Die rechteckigen Regionen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen, die Dextran–FITC aufgenommen haben.

Bei Inkubation bei 0°C ist nur eine geringe Fluoreszenz im FITC–Bereich zu erkennen, die der Autofluoreszenz der Zellen entspricht (nicht gezeigt). Inkubiert man mit Dextran–FITC bei 37°C, verschieben sich 83,1% der Zellen in ihren FITC–Fluoreszenzeigenschaften nach rechts, die Fluoreszenz steigt (Abb. 5). Dass in der 0°C Kontrolle keine erhöhte Fluoreszenz erkennbar war, bedeutet, dass die Aufnahme von Dextran–FITC ein aktiver Vorgang ist, der die physiologische Aktivität der Zelle benötigt. Zur genaueren Analyse wurden gleichbehandelte Zellen auf Objektträger gebracht und die Lokalisation von Dextran–FITC in der Zelle mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

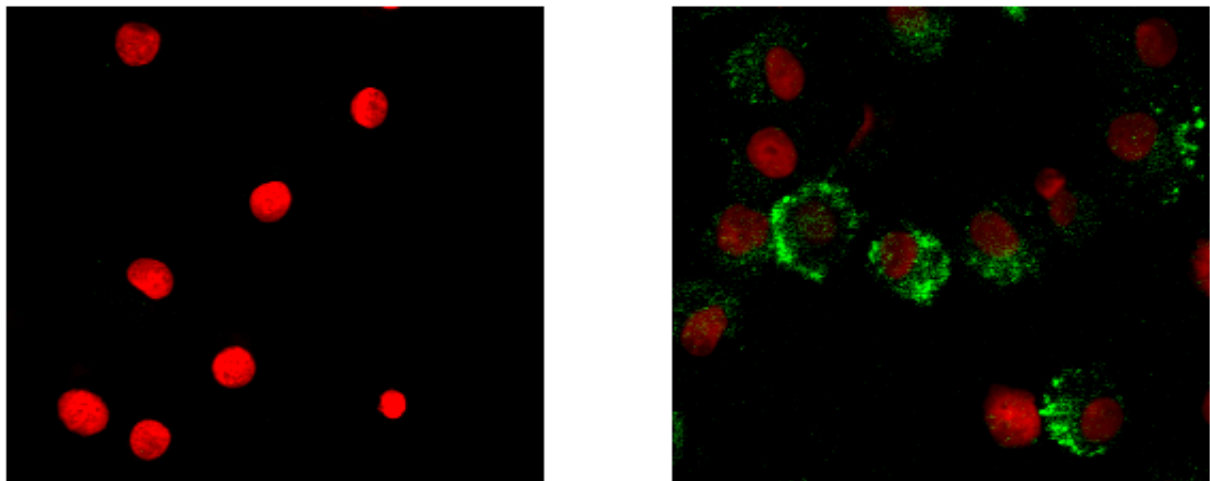


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahme von DC nach Dextran–FITC Inkubation bei 0°C (linkes Bild) bzw. bei 37°C. Grün dargestellt ist die Dextran–FITC Fluoreszenz, rot die Kernfärbung mit TO–PRO–3–Iodid. Anregungswellenlängen 488 nm (FITC) und 633 nm (TO–PRO–3–Iodid), Objektiv mit 20–facher Vergrößerung.

Auch durch konfokale Mikroskopie lässt sich zeigen, dass nur bei 37°C Dextran–FITC aufgenommen wurde. In nur wenigen Fällen ist das Signal als typische Membranmarkierung als Ring um den Zellkern zu lokalisieren (Abb. 6). In diesen Fällen kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob Dextran aufgenommen wurde oder extrazellulär an der Zellmembran liegt. Die grüne Fluoreszenz ist bei den meisten Zellen intrazellulär zu erkennen, somit ist der überwiegende Teil der DC endozytotisch aktiv.

3.2 Etablierung des T_H2-Modells

Allergische Immunreaktionen sind durch eine antigenspezifische T_H2-Reaktion gekennzeichnet. Diese ist u.a. durch die Produktion der lymphozytären Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet und steht im Zusammenhang mit der Produktion von Antikörpern vom Typ IgE. Dieser Isotyp ist für die Ausprägung der allergischen Symptomatik von großer Bedeutung. Antagonisierend zur T_H2-Reaktion ist die T_H1-Reaktion. Ein wichtiges Zytokin, das von T_H1-Lymphozyten produziert wird, ist das IFN- γ . Um das immunmodulatorische Potenzial von DC zu untersuchen, wurde ein Modellsystem etabliert, in dem DC von Allergikern, die mit dem spezifischen Allergen gepulst wurden, mit autologen Lymphozyten kokultiviert wurden. Im Zellkulturüberstand wurden dann IFN- γ und IL-4 als Marker für eine T_H1- bzw. T_H2-Antwort mittels ELISA bestimmt.

Wie unter 2.8 beschrieben, wurden DC von gegen das Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* allergischen Spendern bzw. von gesunden Spendern hergestellt. An Tag 5 der Kultur wurden DC mit aufgereinigtem Majorallergen, DerP1, gepulst, Kontrollen blieben unbehandelt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden DC geerntet, gewaschen, und mit autologen Lymphozyten kokultiviert. Nach 3 Tagen der Kokultur wurden IFN- γ und IL-4 mittels ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.

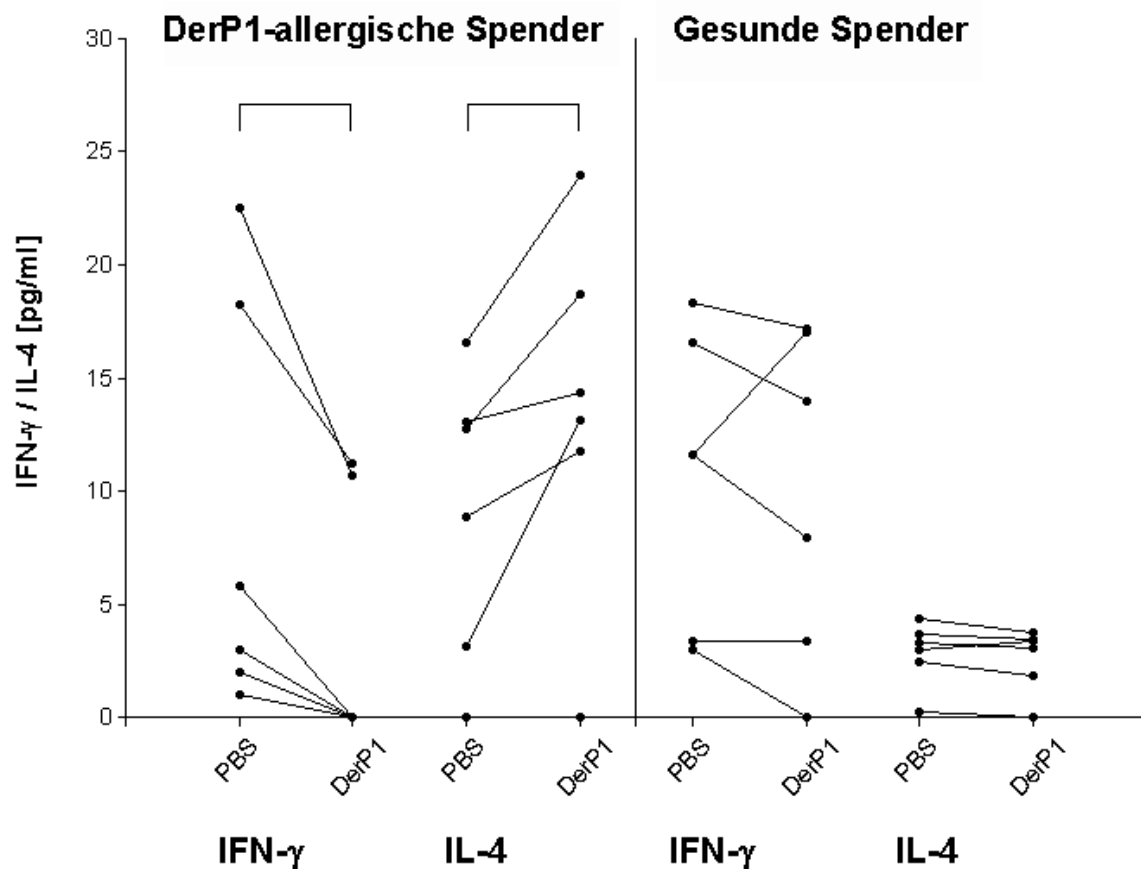


Abb. 7: Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-4 in der Kokultur von autologen Lymphozyten mit allergengepulsten (DerP1) bzw. ungelulsten (Vehikelkontrolle: PBS) DC. DerP1-allergische Spender und gesunde Spender sind einander gegenübergerstellt. Die Klammern zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den verglichenen Gruppen. Das Detektionslimit betrug 4,5 pg/ml.

Die IFN- γ Konzentrationen von Allergikern und gesunden Spendern waren mit ungelulsten DC vergleichbar. Vorbehandlung mit DerP1 resultierte bei Allergikern in einer Reduktion von IFN- γ , wohingegen für Nicht-Allergiker kein Unterschied zwischen allergengepulsten und nicht gepulsten DC feststellbar war (Abb. 7).

IL-4 Konzentrationen befanden sich bei Gesunden unterhalb des Detektionslimits des ELISA, unabhängig davon ob DerP1 zugesetzt wurde oder nicht. Im Gegensatz dazu war IL-4 bei Allergikern mit ungelulsten DC messbar. Der Zusatz von DerP1 induzierte einen signifikanten Anstieg der IL-4 Konzentration.

Die verstärkte Ausschüttung von IL-4 und die Reduktion von IFN- γ in Abhängigkeit von Allergen und allergischen Spendern entspricht einer allergenspezifischen T_H2-Immunreaktion in diesem Modell.

3.3 Einfluss der Stimulation mit MALP-2 und IFN- γ auf die T_H2 Reaktion

Für die Etablierung des T_H2-Modells wurden DC benutzt, die nicht zur Ausreifung stimuliert wurden. In den folgenden Versuchsreihen sollte bestimmt werden, auf welche Weise die Stimulierung von allergengepulsten DC mit MALP-2 und IFN- γ die bestehende T_H2-Reaktion beeinflusst.

3.3.1 MALP-2 und IFN- γ induzieren synergistisch Reifungs- und Aktivierungsmarker von DC

Unreife DC von Allergikern wurden an Tag 5 mit DerP1 gepulst. Zusätzlich wurde mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert. Kontrollansätze ohne Allergen bzw. mit nur einer der Stimulantien wurden eingeschlossen. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet. Die Oberflächenmoleküle CD 80, CD 86, CD 40, HLA-DR, CD 83, CD 14 und CD 1a wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

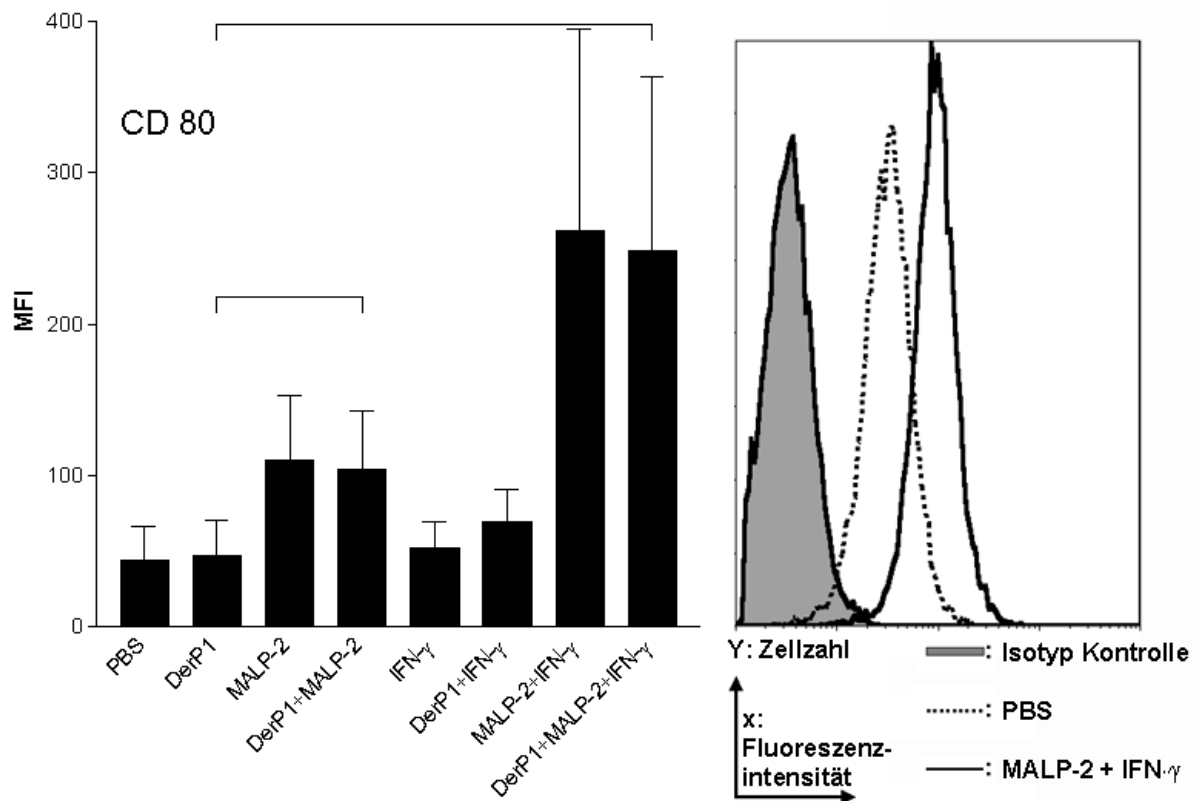


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse der CD 80 Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Linker Teil: der Mittelwert \pm Standardfehler der mittleren Fluoreszenzintensität von 6 individuellen Experimenten wird gezeigt. Die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle ist abgezogen. Die Klammer indiziert signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den allergengepulsten Gruppen. Rechter Teil: Exemplarische Darstellung eines typischen Experiments. Gezeigt sind die Fluoreszenzprofile der Isotypkontrolle sowie die spezifisch gefärbten Profile nach Stimulierung mit PBS (Vehikel) und mit MALP-2 und IFN- γ .

CD 80 ist ein kostimulatorisches Oberflächenmolekül, das nach Reifung von DC verstärkt exprimiert wird. Es hat eine Funktion in der Aktivierung von T-Zellen durch direkten Zell-Zellkontakt.

Auf unstimulierten DC war es nur schwach exprimiert. Das Pulsen mit Allergen hatte keinen Einfluss auf die Expression. MALP-2 bewirkte die Heraufregulierung des Moleküls, was wiederum unabhängig von der Allergengabe war. IFN- γ , sowie die Kombination von IFN- γ und DerP1, hatten keinen Einfluss auf CD 80. Die Doppelstimulation mit MALP-2 und IFN- γ bewirkte eine drastische Erhöhung der Expression, die nicht durch DerP1 beeinflusst wurde (Abb. 8).

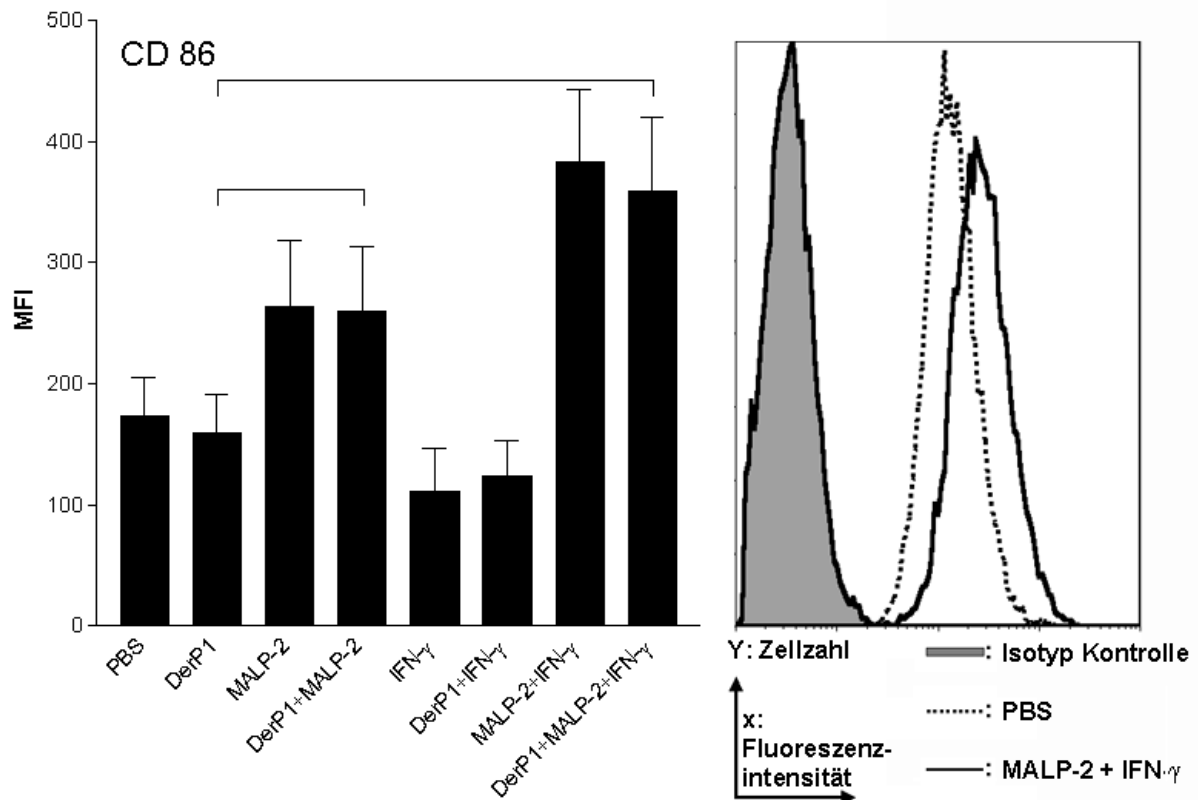


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der CD 86 Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

CD 86 gehört zur gleichen Familie wie CD 80, es wirkt ebenfalls kostimulatorisch und ist ein Reifungsmarker für DC.

Die Regulation von CD 86 war mit CD 80 vergleichbar. Es war ebenfalls auf unstimulierten DC exprimiert. Die Expression wurde durch MALP-2, nicht jedoch durch IFN- γ , gesteigert. Der vermeintliche Abfall nach IFN- γ Gabe im Vergleich zur PBS Gruppe erwies sich als statistisch nicht signifikant. Die höchste Expression war durch die parallele Gabe von MALP-2 und IFN- γ zu erreichen. CD 80 entsprechend bewirkte die zusätzliche Allergengabe keine Veränderungen in den jeweiligen Gruppen (Abb. 9).

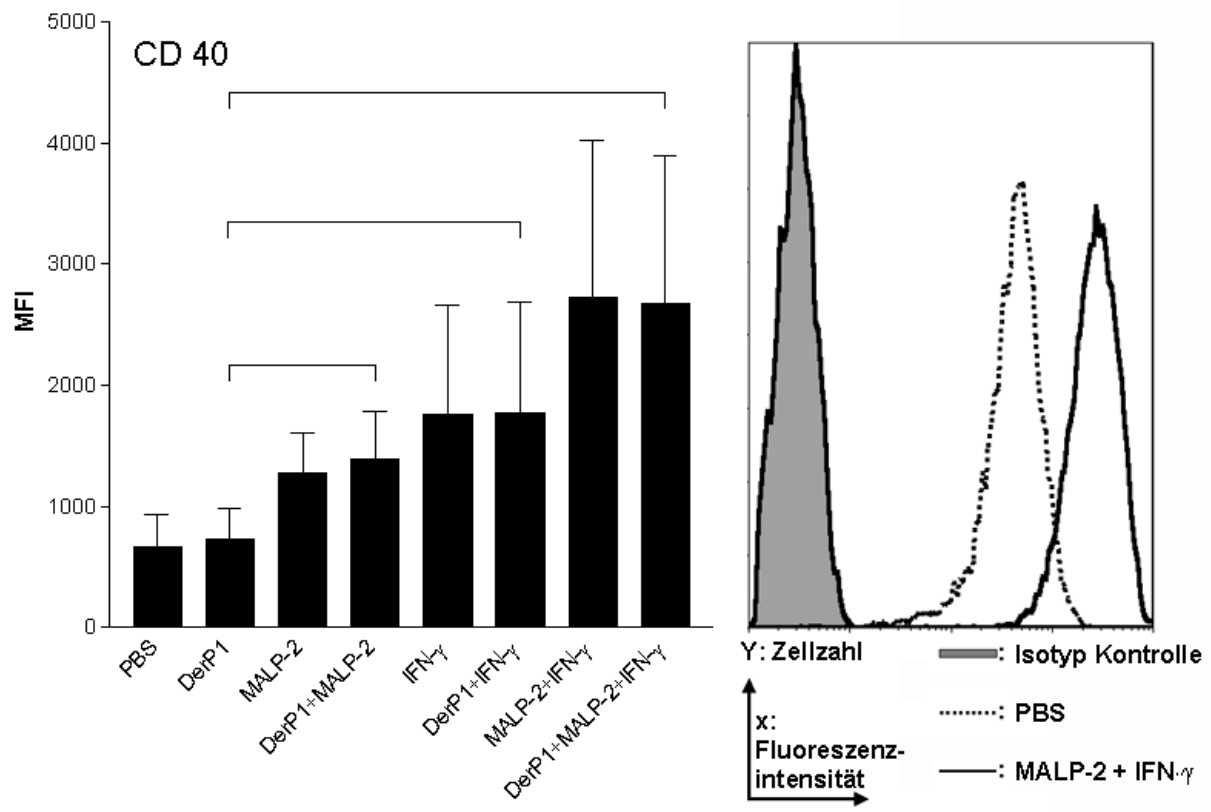


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analyse der CD 40 Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

CD 40 ist ebenfalls ein Molekül, das an der Zell-Zell-Kommunikation von DC und T-Zellen beteiligt ist. Im Gegensatz zu CD 80 und CD 86 wirkt es primär entgegengesetzt, die CD 40 Ligation führt zur Aktivierung von DC.

CD 40 war auch auf unreifen DC (PBS) hoch exprimiert. Die Expression ließ sich durch Gabe von MALP-2 steigern. IFN- γ Gabe resultierte für CD 40, im Gegensatz zu CD 80 und CD 86, ebenfalls in einer erhöhten Expression. Kostimulation mit MALP-2 und IFN- γ hatte den stärksten Effekt, während die DerP1 Gabe ohne Auswirkung blieb (Abb. 10).

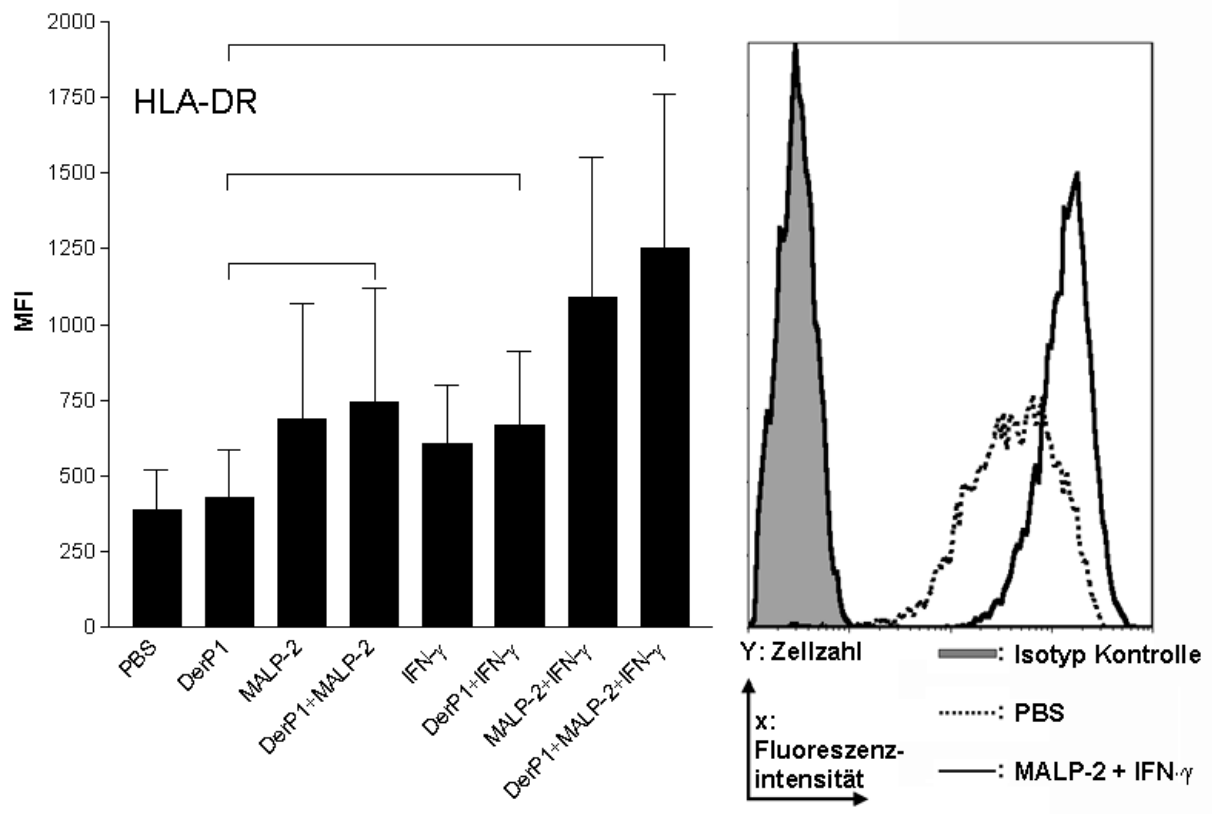


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

HLA-DR gehört zum MHC II Gencluster. Aufgabe ist die Präsentation von prozessiertem Antigen an CD 4-positive T-Helferzellen.

Die Erhöhung der Expression von HLA-DR durch Stimulation mit MALP-2 oder IFN- γ erreichte statistische Signifikanz. Dies war ebenso durch gleichzeitige Gabe beider Substanzen, unabhängig vom Allergenpuls, gegeben. HLA-DR war auch auf unstimulierten DC exprimiert (Abb. 11).

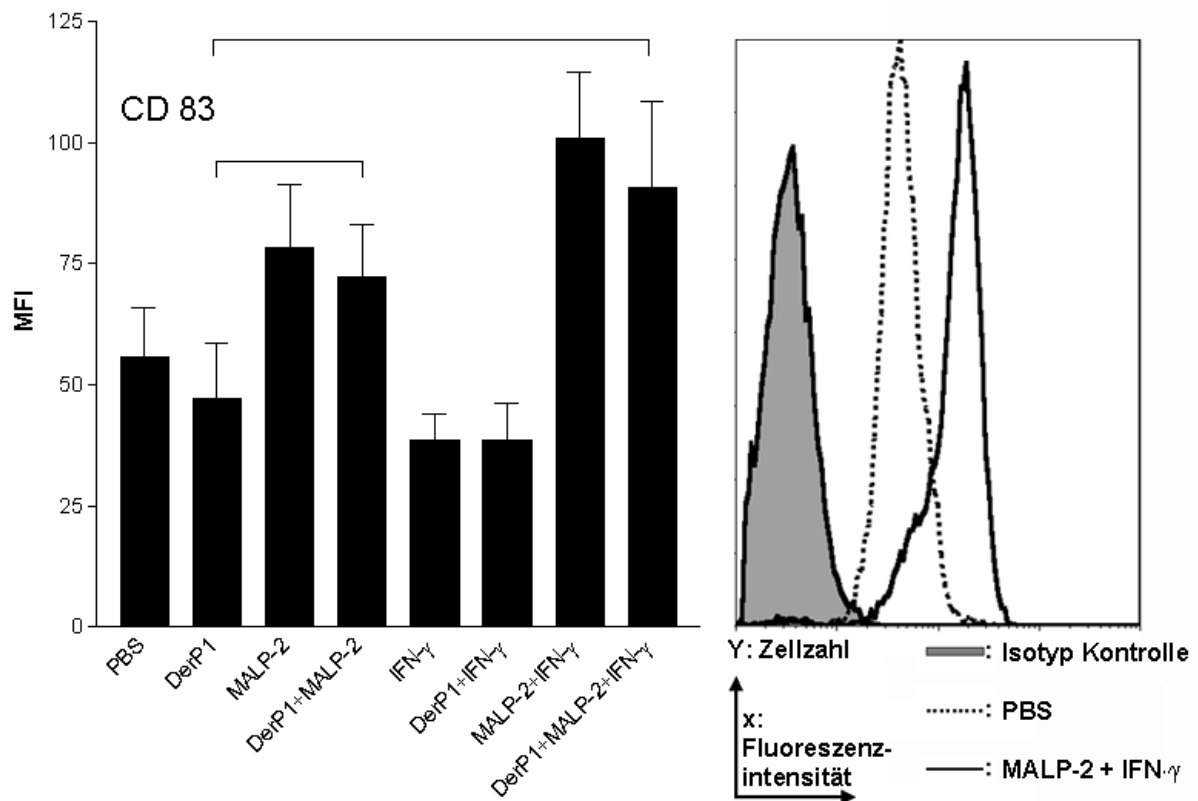


Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der CD 83 Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

CD 83 ist ein klassischer Reifungs- und Differenzierungsmarker für DC, der nicht auf Monozyten exprimiert ist. Seine Funktion wird in der Zell-Zellkommunikation vermutet.

CD 83 war auf unreifen DC nur sehr schwach exprimiert. Stimulierung mit MALP-2 und mit MALP-2 plus IFN- γ verstärkten die Expression, während IFN- γ alleine keinen Effekt hatte. Ebenso hatte die Allergengabe keinen Einfluss auf die Expression (Abb. 12).

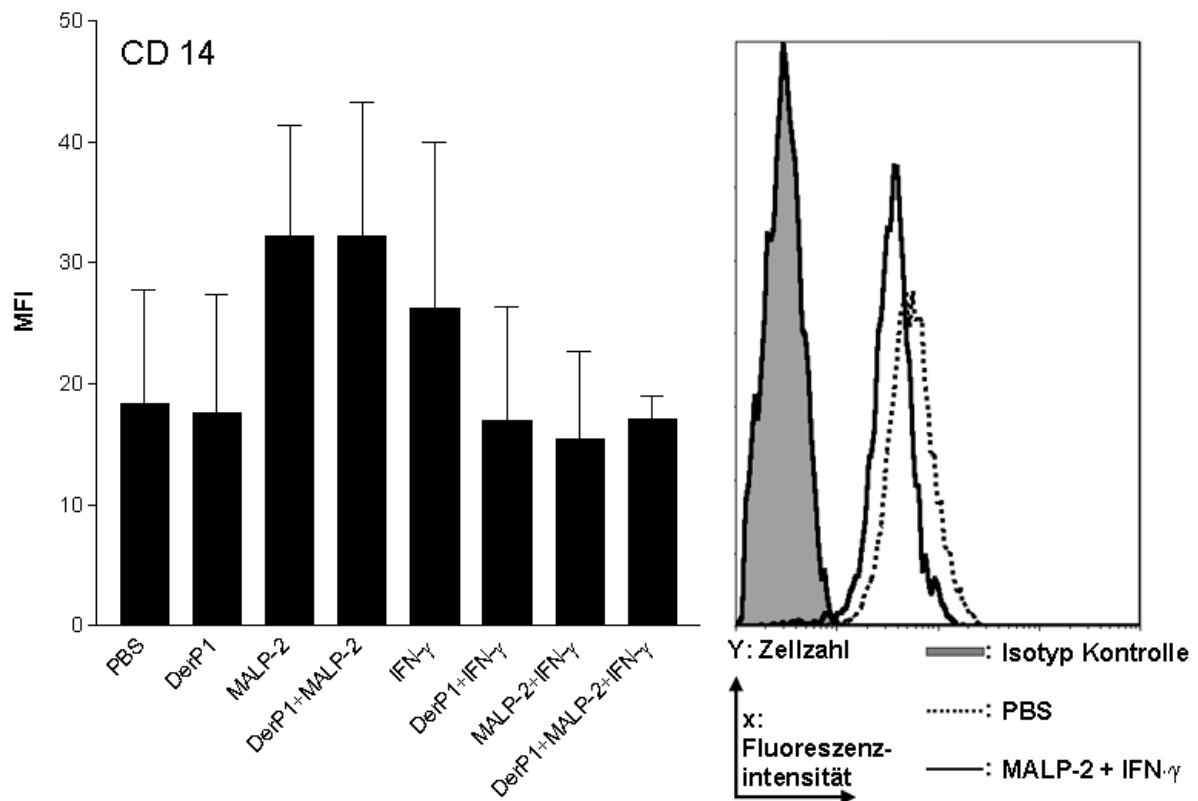


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der CD 14 Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

CD 14 ist der Rezeptor für LPS im Komplex mit dem LPS bindenden Protein LBP. CD 14 selbst besitzt keine intrazellulären, signaltransduzierenden Domänen, seine Rolle bei der Vermittlung der Effekte von LPS ist unklar. CD 14 ist ein Marker für unreife DC und Monozyten.

CD 14 war in sehr geringem Masse auf unstimulierten DC nachzuweisen. Die scheinbar erhöhte Expression nach MALP-2 Gabe erreichte ebensowenig Signifikanz wie die der anderen Stimulationen (Abb. 13).

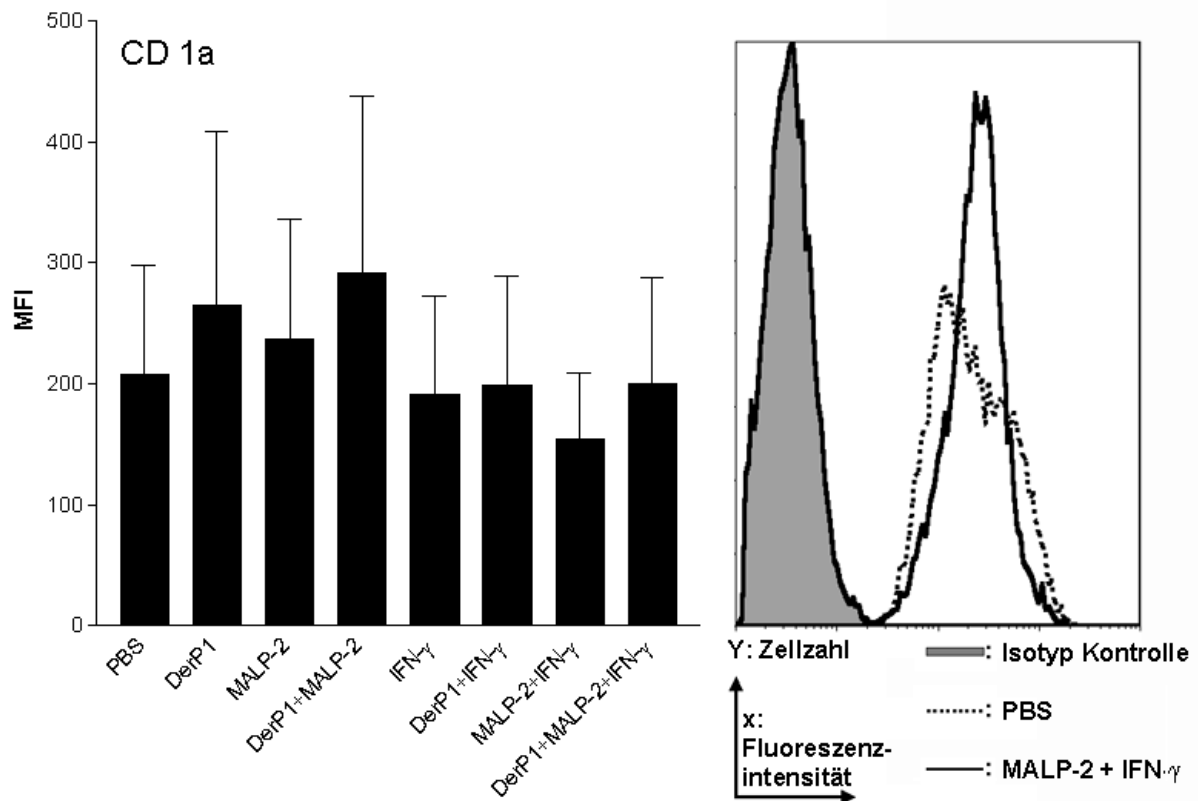


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der CD 1a Expression von DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Darstellung ist in Abb. 8 erläutert.

Die Funktion von CD1a ist mit der Präsentation von Nicht-Peptid-Antigenen assoziiert.

Es war vergleichsweise hoch auf unreifen DC exprimiert und unterlag keiner signifikanten Regulation durch die verschiedenen Stimulierungsprotokolle (Abb. 14).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Pulsen von DC mit Allergen keinen Effekt auf die Expression der gemessenen Oberflächenmoleküle hatte. MALP-2 regulierte CD 80, CD 86, CD40, HLA-DR und CD 83 hoch, während IFN- γ nur auf HLA-DR expressionssteigernd wirkte. Benutzte man beide Substanzen zusammen, wurde eine starke, synergistische Aufregulation von CD 80, CD 86, CD40, HLA-DR und CD 83 beobachtet. Die Expression von CD 1a und die ohnehin sehr schwache CD14 Expression wurden nicht beeinflusst.

3.3.2 Die Induktion von IL-12 durch Stimulation mit MALP-2 und

IFN- γ geht mit der Reduktion von IL-10 einher

DC wurden nach 48-stündiger Stimulation geerntet. Dabei wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, um darin die Konzentration der Zytokine TNF, IL-10 und IL-12p70, die für die Interaktion von DC mit Lymphozyten relevant sind, zu bestimmen. Die Messung wurde, wie unter 2.13 beschrieben, mittels ELISA durchgeführt.

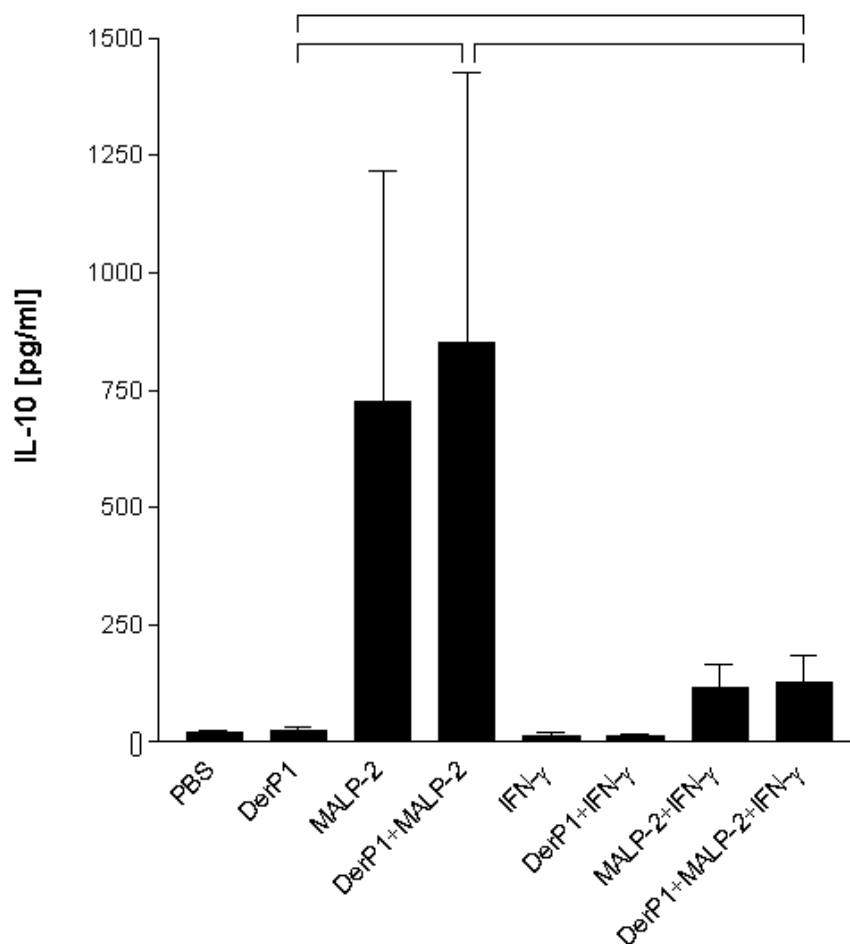


Abb. 15: Sezernierung von IL-10 durch DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Klammer indiziert signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den allergengepulsten Gruppen. Das Detektionslimit betrug 12 pg/ml.

IL-10 ist ein immunregulatorisches Zytokin. Es wirkt als Inhibitor für diverse Zellfunktionen wie die Makrophagenaktivierung. Dabei wird es auch mit der Ausbildung einer T_H2 -Immunreaktion in Verbindung gebracht.

IL-10 wurde von unstimulierten DC in vergleichsweise geringen Mengen produziert. Stimulation mit MALP-2 induzierte eine starke Hochregulierung, während $IFN-\gamma$ im Vergleich zur PBS-Kontrolle keinen Effekt hatte. Gleichzeitige Stimulation mit MALP-2 und $IFN-\gamma$ reduzierte die MALP-2 induzierte Erhöhung der IL-10 Produktion, sie blieb jedoch über dem Niveau der unstimulierten Ansätze. Die Zugabe von DerP1 hatte keinen Effekt (Abb. 15).

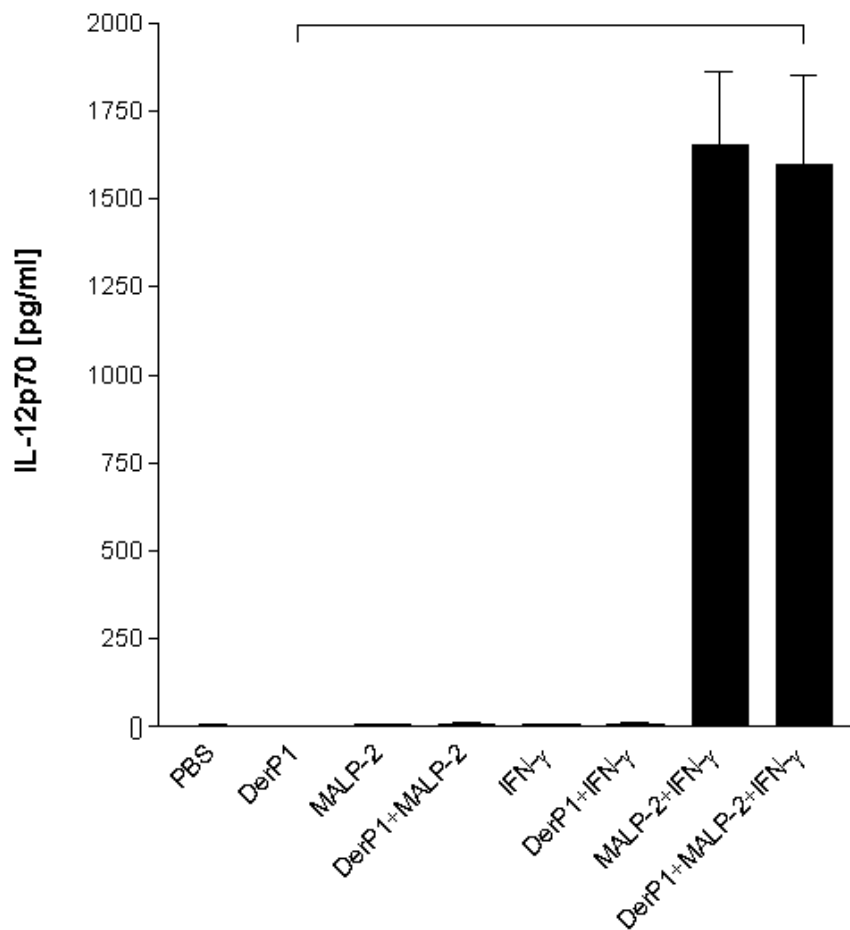


Abb. 16: Sezernierung von IL-12p70 durch DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, $IFN-\gamma$ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Klammer indiziert signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den allergengepulsten Gruppen. Das Detektionslimit betrug 15 pg/ml.

IL-12p70 ist die bioaktive Komponente der IL-12 Familie. Es ist ein Heterodimer aus einer p35 und einer p40 Untereinheit. Es wirkt auf NK-Zellen sowie auf CD 4-positive T-Helferzellen. Hier kommt ihm eine besonders wichtige Bedeutung zu, da es die Differenzierung zu T_H1-Zellen induziert.

Die Konzentration von IL-12p70 in unstimulierten DC sowie nach Behandlung mit MALP-2 oder IFN- γ lag im unteren Detektionsbereich des ELISA. Die gleichzeitige Gabe beider Substanzen induzierte eine massive Ausschüttung des Zytokins. Wiederum hatte die zusätzliche Gabe von DerP1 keinen Effekt (Abb. 16).

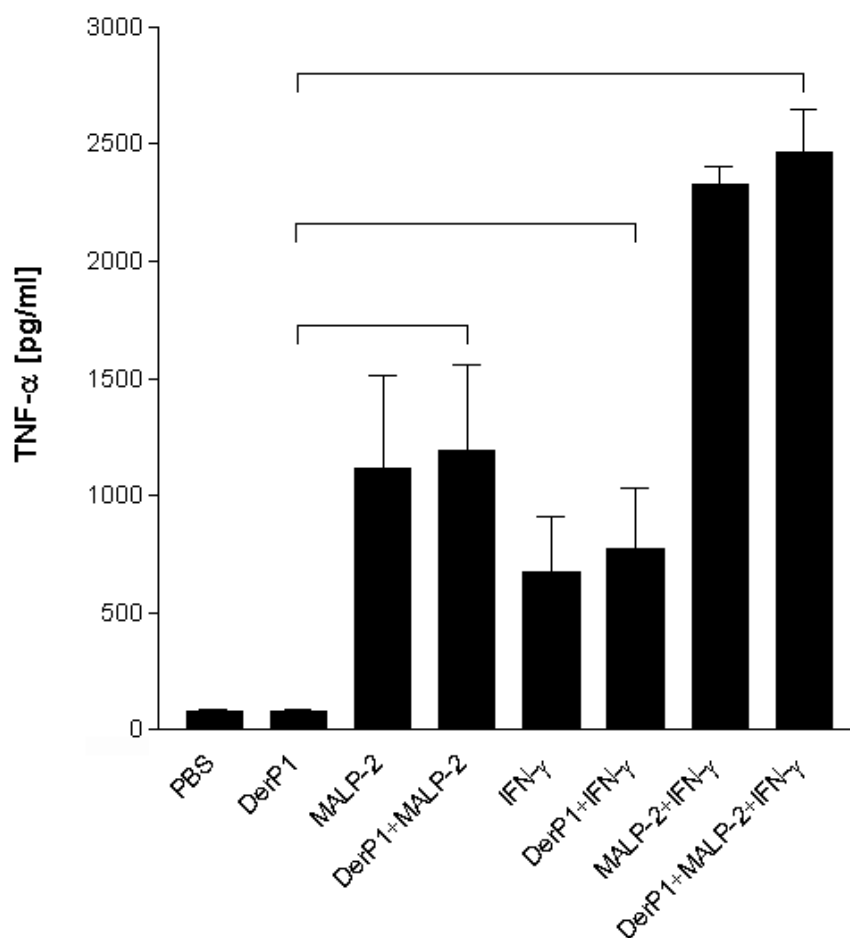


Abb. 17: Sezernierung von TNF- α durch DC nach Behandlung mit DerP1, MALP-2, IFN- γ und Kombinationen derselben. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Klammer indiziert signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den allergengepulsten Gruppen. Das Detektionslimit betrug 12 ,5 pg/ml.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin mit breitem Wirkungsspektrum. So induziert es lokale Entzündungen und ist an der Endothelaktivierung beteiligt.

TNF- α wurde von unreifen DC in geringer Menge abgegeben. Sowohl MALP-2 als auch IFN- γ bewirkten die Erhöhung der Zytokinkonzentration, während beide Substanzen zusammen die Produktion synergistisch steigerten. Auch hier hatte der Allergenpuls keinen Effekt (Abb. 17).

Zusammenfassend beeinflusste IFN- γ weder die Produktion von IL-10 noch die von IL-12p70. MALP-2 induzierte nur eine gesteigerte IL-10 Produktion und hatte keinen Effekt auf IL-12p70. Ein großer Unterschied trat bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen auf: IL-12p70 wurde massiv hochreguliert, was mit der Reduktion von IL-10 einher ging. MALP-2 und IFN- γ induzierten bei alleiniger Gabe TNF- α und wirkten in Kombination synergistisch. Die Gabe von DerP1 hatte keinen Effekt.

3.3.3 MALP-2 und IFN- γ verstärken synergistisch die allergenabhängige Proliferation

Ein wichtiger DC-medierter Effekt ist die Induktion von Zellteilung in Lymphozyten. Durch klonale Expansion von antigenspezifischen Effektorzellen wird *in vivo* eine sich schnell verstärkende adaptive Immunreaktion ausgebildet. Im hier gewählten autologen, serumfreien, allergischen System ist zu erwarten, dass das Maß der Proliferation von der Anwesenheit des Allergens und der Fähigkeit und Frequenz der DC, das Antigen zu präsentieren und proliferationsfördernde Signale zu geben, abhängt. Die Induktion lymphozytärer Proliferation ist also ein wichtiger Parameter für therapeutisch wirksame DC. Aufgrund der gegebenen Sensitivität der Spender gegen das Allergen ist als dominierende Reaktion eine sekundäre Immunantwort zu erwarten.

An Tag 7 der Zellkultur, 48 Stunden nach Gabe der Stimulantien, wurden DC geerntet. Ein Teil der Zellen, der nicht durchflusszytometrisch gemessen wurde, wurde zweimal gewaschen, um freie Stimulantien zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen in frischen Kulturplatten ausgesät. Dabei wurden die Zellen über 7 Reihen im Verhältnis 1:3 titriert, so dass in der ersten Reihe eine Zellzahl von $3,3 \times 10^4$ Zellen in 100 μ l und in der siebten Reihe 46 Zellen in 100 μ l eingestellt wurden. Zu jeder Reihe wurden 1×10^5 autologe, kryokonservierte Lymphozyten

zugegeben und für 5 Tage inkubiert. An Tag 5 wurde diese Kokultur mit tritiiertem Thymidin gepulst und für weitere 18 Stunden inkubiert. Die in die Zellen inkorporierte Radioaktivität wurde mittels Szintilationsmessung quantifiziert (siehe auch 2.14).

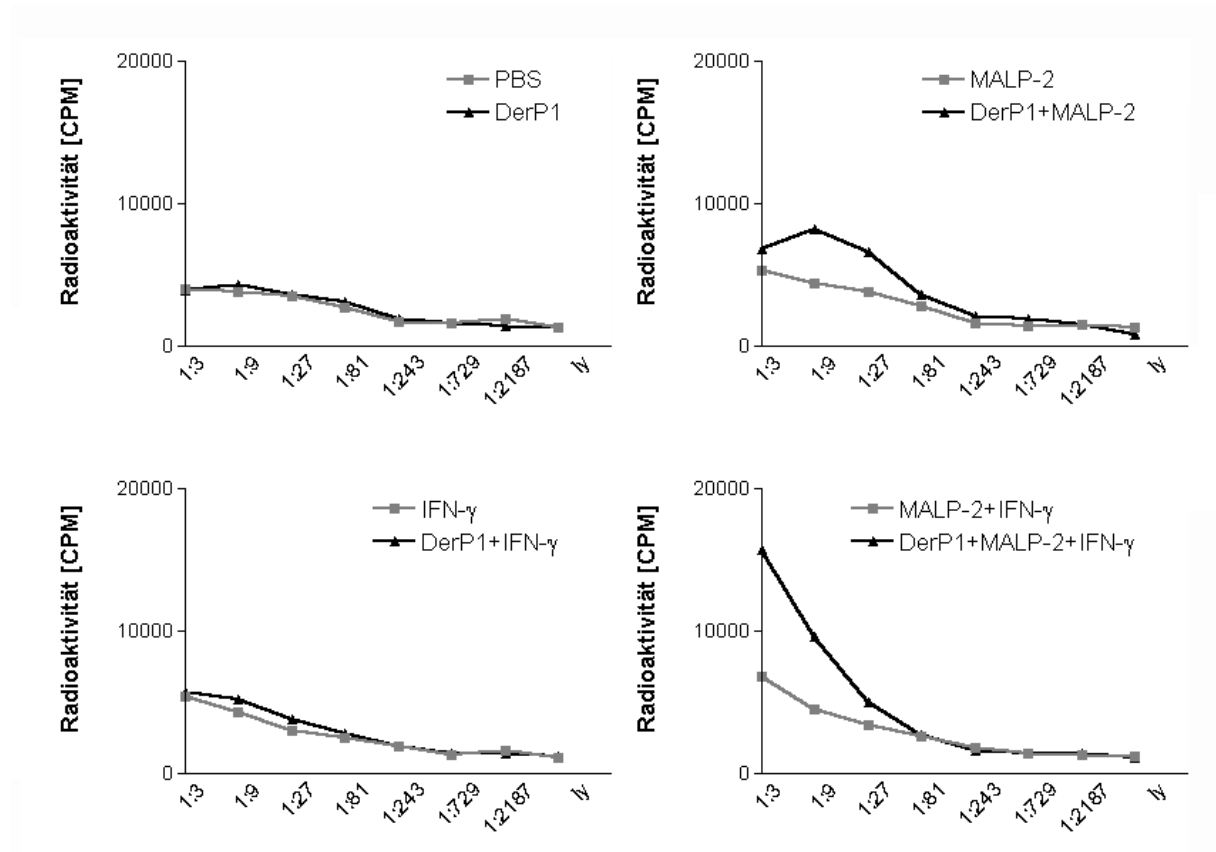


Abb. 18: Proliferation in der Kokultur in Abhängigkeit vom Allergen. Jede Kurve ist aus dem Mittelwert von 6 individuellen Experimenten von titrierten DC, die mit autologen Lymphozyten kokultiviert wurden, gebildet. Die x-Achsenbeschriftung gibt das Verhältnis zwischen DC und Lymphozyten (der letzte Punkt (Ly) sind Lymphozyten alleine), die y-Achse die Radioaktivität als Zählungen pro Minute (engl.: counts per minute, cpm) wieder. Die graue Kurve repräsentiert die proliferative Antwort ohne Allergengabe, die schwarze Kurve die Antwort mit Allergen für die Vorstimulation mit MALP-2, IFN- γ , beiden Substanzen oder der Vehikelkontrolle (PBS) von DC vor der Kokultur.

In Abbildung 18 ist die Abhängigkeit der Proliferation vom Allergenpuls dargestellt. Bei unreifen DC (PBS) oder mit IFN- γ vorstimulierten war keine Proliferation messbar. MALP-2 und die Kombination von MALP-2 und IFN- γ induzierten zwar Proliferation, diese erhob sich aber nur nach Zugabe von Allergen über den Hintergrund der Vehikelkontrolle hinaus.

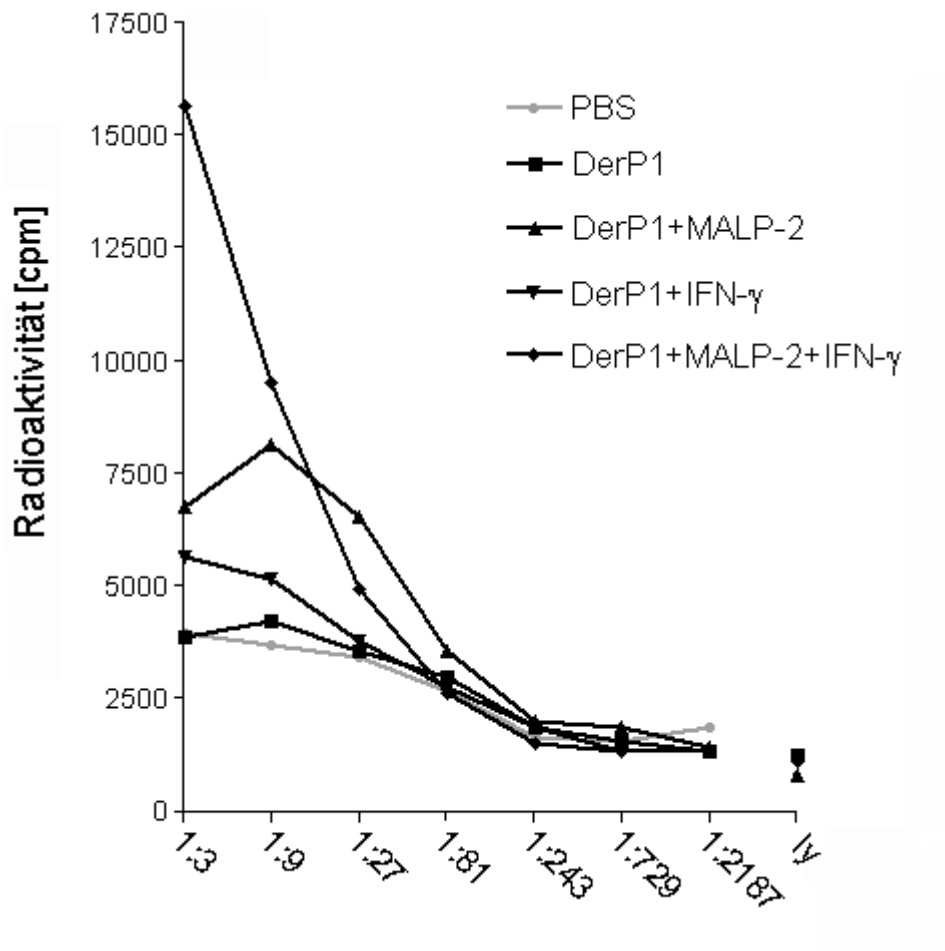


Abb. 19: Vergleich der Proliferationsabhängigkeit von den Stimulationsprotokollen. Die Kurven repräsentieren die Vorstimulation von DC nur mit Allergen, mit MALP-2 und Allergen, IFN- γ und Allergen sowie MALP-2, IFN- γ und Allergen sowie die Vehikelkontrolle (PBS). Die Art der Darstellung ist in Abb. 18 erläutert.

Die Proliferation von Lymphozyten alleine (ohne die unterschiedlich behandelten DC) lag erwartungsgemäß im Bereich des Hintergrundsignals. Die Kokultur mit allergengepulsten DC induzierte keine gesteigerte lymphozytäre Proliferation im Vergleich zur PBS Kontrolle. MALP-2 Vorstimulation versetzte DC in die Lage, Proliferation zu induzieren. Durch IFN- γ war kein signifikanter Anstieg gegeben. Die Kombination von MALP-2 und IFN- γ zeigte wieder einen synergistischen Effekt: Hier war die stärkste Proliferation zu messen (Abb. 19).

3.3.4 Die kombinierte Vorbehandlung von DC mit MALP-2 und

IFN- γ moduliert die bestehende T_H2 Immunreaktion nach T_H1

Der Effekt der Vorbehandlung von DC mit MALP-2 und IFN- γ wurde auf die allergenabhängige T_H2-Reaktion von allergischen Spendern untersucht. Dazu wurden die Zytokine IFN- γ als Marker für die T_H1 Reaktion und IL-4 als Marker für die T_H2 Reaktion im Zellkulturüberstand, wie unter 2.13 beschrieben, mittels ELISA quantifiziert. Für diese Untersuchungen wurde eine Kokultur mit einem DC – zu – Lymphozyten Verhältnis von 1:3 gewählt, da es sich in den Proliferationsmessungen als optimal herausgestellt hatte.

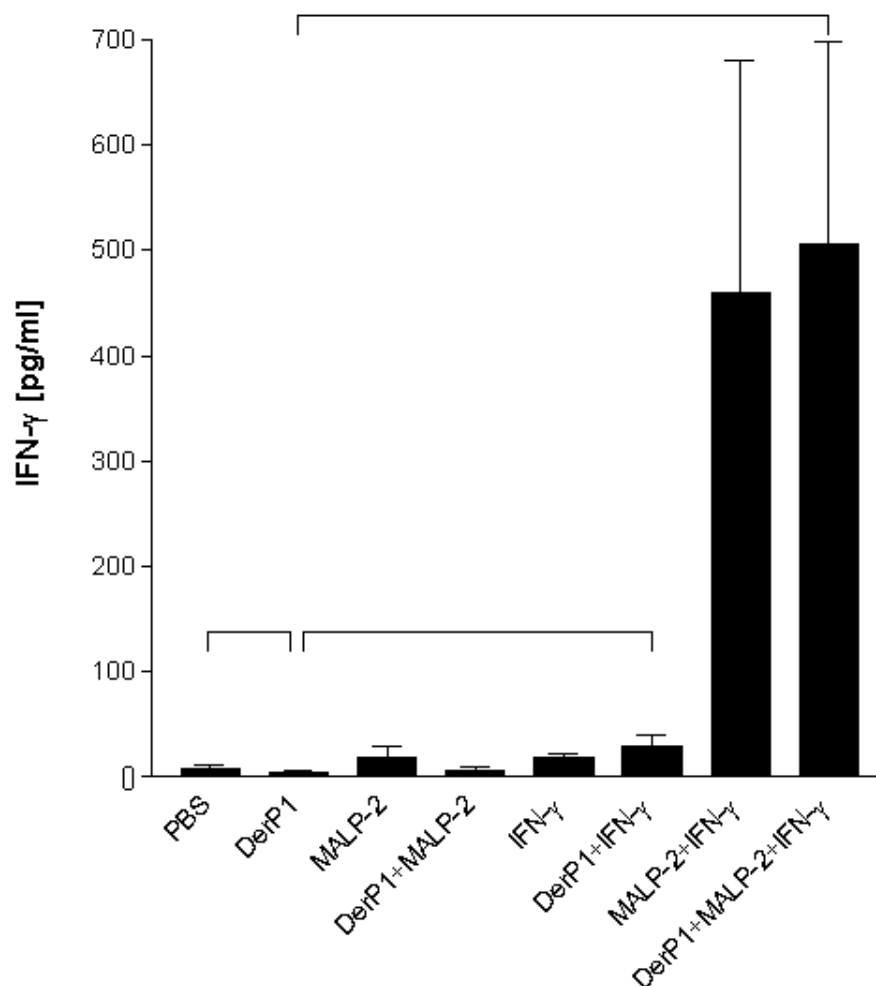


Abb. 20: Produktion von IFN- γ in der Kokultur von DC mit autologen Lymphozyten. DC wurden mit DerP1, MALP-2 oder IFN- γ bzw. deren Kombinationen vorbehandelt. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Klammer indiziert signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Gruppen. Das Detektionslimit betrug 4,5 pg/ml.

Wie schon in Abbildung 7 gezeigt, induzierte der Allergenpuls eine signifikante Reduktion der IFN- γ Produktion im Vergleich zur PBS Kontrolle. Dieser Effekt ist aufgrund des Maßstabes dieser Abbildung schwer zu erkennen. Eine MALP-2 Behandlung bewirkte eine leichte Erhöhung, die durch gleichzeitige Allergengabe wieder rückgängig gemacht wurde. Die Stimulation mit IFN- γ führte ebenfalls zu einer leichten Erhöhung, die unabhängig von der Allergengabe war. Ein extrem starker Effekt ließ sich bei Kombination von IFN- γ und MALP-2 erkennen: Die Konzentration im Kokulturüberstand stieg auf das 50-fache im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Dies war sowohl ohne als auch mit Allergengabe messbar (Abb. 20).

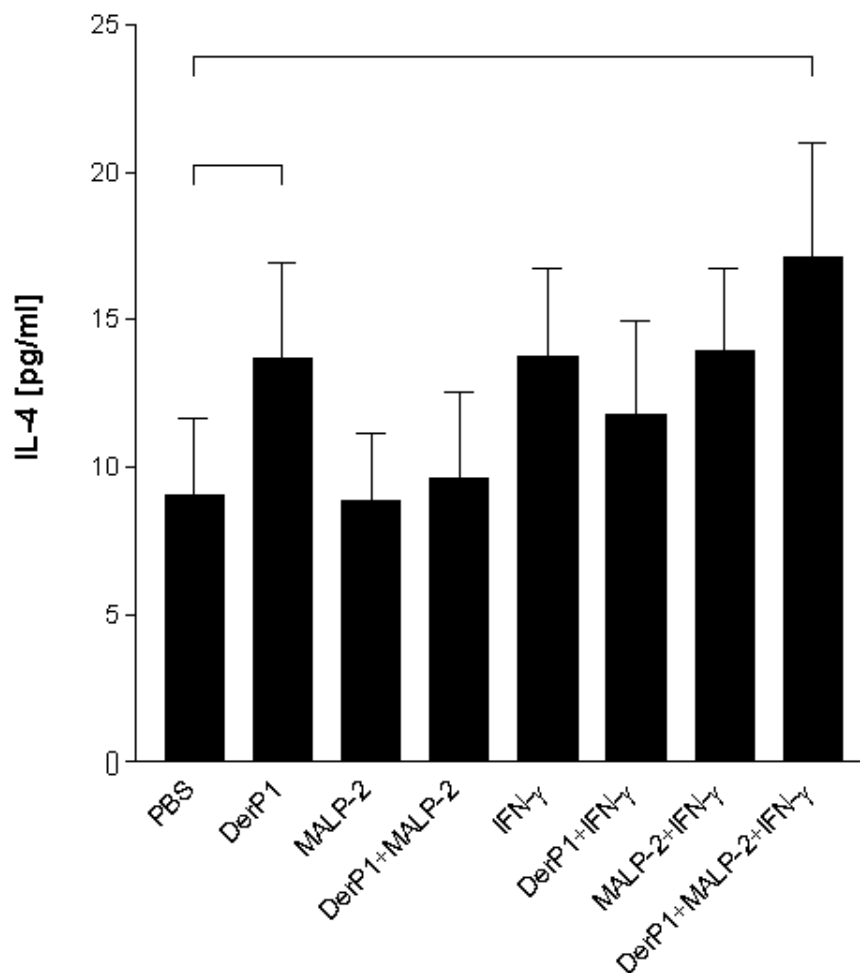


Abb. 21: Produktion von IL-4 in der Kokultur von DC mit autologen Lymphozyten. DC wurden mit DerP1, MALP-2 oder IFN- γ bzw. deren Kombinationen vorbehandelt. PBS bezeichnet die Vehikelkontrolle. Die Klammer indiziert signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Gruppen. Das Detektionslimit betrug 4,5 pg/ml.

Schon in Abbildung 7 wurde gezeigt, dass die DerP1 Gabe die IL-4 Produktion im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant erhöht. MALP-2 hatte keinen Einfluss, jedoch wurde die DerP1-abhängige Induktion durch MALP-2 in diesem System wieder auf Kontrollwerte reduziert. IFN- γ hatte einen ähnlichen Effekt wie MALP-2, erreichte aber keine Signifikanz. Die Kombination beider Substanzen induzierte eine schwache Erhöhung von IL-4 im Vergleich zur PBS-Kontrolle, nicht aber zur alleinigen DerP1 Gabe (Abb. 21).

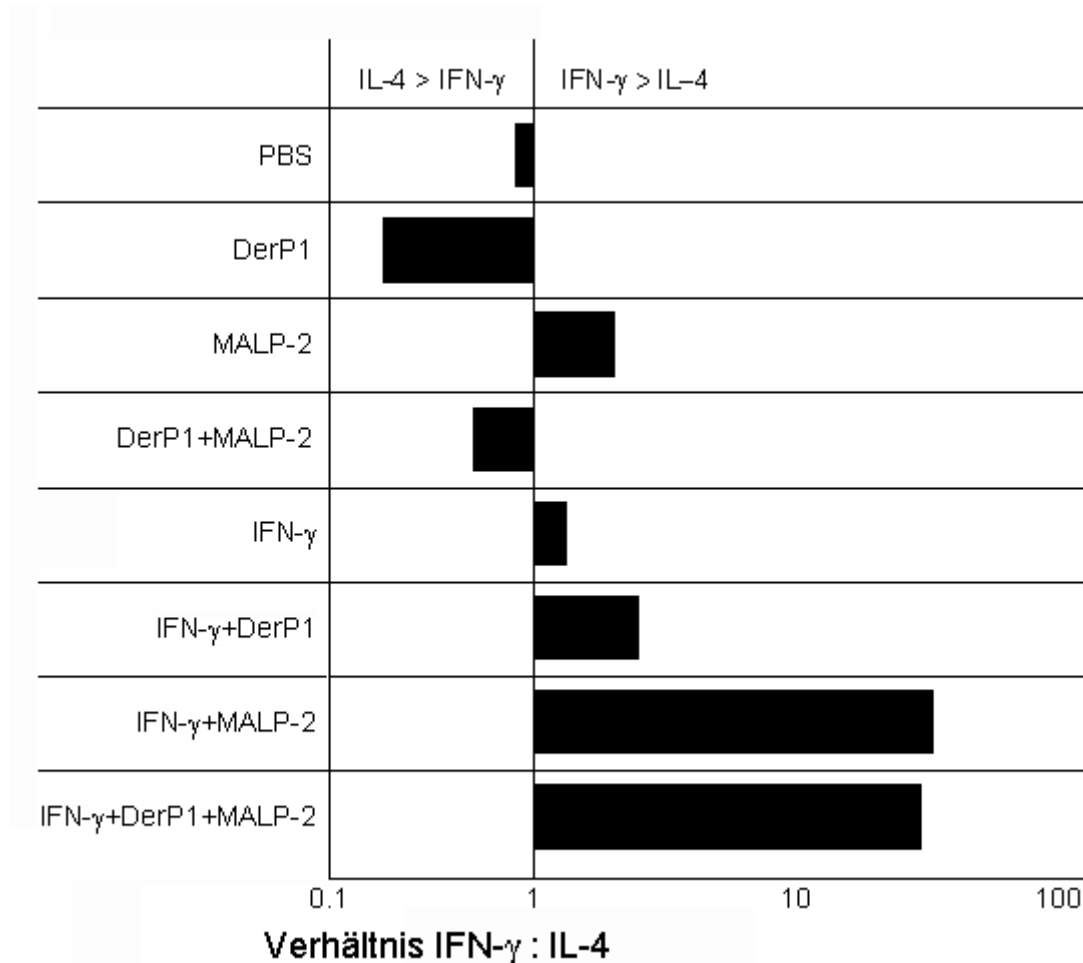


Abb. 22: Logarythmische Darstellung der Verhältnisse von IFN- γ zu IL-4. Ermittlung der Werte der Zytokine wie in Abb. 20 bzw. 21 beschrieben.

Unstimulierte DC von Allergikern induzierten in Lymphozyten mehr IL-4 als IFN- γ . Dieses Verhältnis wurde nach Allergenpulsung verstärkt. Durch MALP-2 wurde mehr IFN- γ als IL-4 produziert, was durch Allergengabe umgekehrt wurde. Die Vorstimulation von DC mit IFN- γ ließ Lymphozyten höhere Konzentrationen dieses

T_H1-Markern produzieren. Dies wurde durch Antigengabe verstärkt. Eine parallele Vorbehandlung mit MALP-2 und IFN- γ verschob das Verhältnis sehr eindeutig Richtung IFN- γ und traf auf die allergenfreie Kontrolle und auch auf die Allergenstimulation zu. Grund für dieses Verhältnis war die mehr als 50-fach höhere Produktion an IFN- γ , während IL-4 verglichen mit der PBS-Gruppe nur um das 1,5-fache stieg (Abb. 22). Dieses Zytokinmuster ist charakteristisch für eine T_H1-Reaktion.

3.4 Die gesteigerte Produktion an IFN- γ geht mit einer erhöhten Frequenz an IFN- γ produzierenden Zellen einher

Mittels ELISA kann die Konzentration eines Zytokins in einer Lösung bestimmt werden. Dies läßt aber keine Aussagen über die Frequenz an Zellen, die das entsprechende Zytokin produzierten, zu. Die Frequenz der Zellen ist jedoch ein wichtiger Parameter, um Behandlungseffekte zu beurteilen. Deshalb wurde hier die Frequenz IFN- γ produzierender Zellen in der Kokultur für ausgewählte Experimente bestimmt. Dazu wurde ein ELISpot Assay wie unter 2.16 beschrieben durchgeführt.




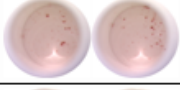
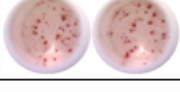
Kulturbedingungen Zellen	Stimulation	Bild	ausgezählte ELISpots
DC	DerP1		Ø
DC	DerP1+MALP-2+IFN- γ		Ø
Ly	Ø		Ø
DC+Ly	DerP1		27
DC+Ly	DerP1+MALP-2+IFN- γ		89

Abb. 23: Frequenz IFN- γ produzierender Lymphozyten in der Kokultur von DC, die entweder nur mit Allergen gepulst wurden oder mit Allergen, MALP-2 und IFN- γ vorbehandelt wurden, und autologen

Lymphozyten (Ly) von Allergikern. Kontrollansätze, in denen entweder DC oder Lymphozyten alleine gemessen wurden, sind angefügt. Links sind Fotografien des ELISpot dargestellt, rechts die Anzahl der Spots nach Auszählung und Bildung des Mittelwertes der Doppelansätze.

In der alleinigen Kultur von DC, die entweder nur mit Allergen oder mit Allergen, MALP-2 und IFN- γ vorbehandelt wurden, waren erwartungsgemäß keine IFN- γ produzierenden Zellen zu erkennen. Ebenso produzierten Lymphozyten ohne Stimulation durch DC kein IFN- γ . Kokultivierte man DC nach Allergenpuls mit Lymphozyten, war eine geringe Frequenz IFN- γ produzierender Zellen zu erkennen. Nach Vorstimulation der DC mit MALP-2 und IFN- γ stieg die Frequenz stark an (Abb. 23).

3.5 Der IFN- γ und Proliferation induzierende Effekt ist IL-12 abhängig

IL-12p70 ist als Zytokin beschrieben, das maßgeblich an der Ausbildung einer T_H1-Immunreaktion beteiligt ist. In diesem Modell wurde beobachtet, dass die Induktion von IL-12 durch simultane MALP-2 und IFN- γ Stimulation mit der erhöhten Proliferation von Lymphozyten und der vermehrten Produktion von IFN- γ , nicht aber von IL-4, einher geht. Um zu überprüfen, ob die beschriebenen lymphozytären Effekte durch IL-12 vermittelt werden, wurden Blockierungsexperimente an ausgewählten Versuchsansätzen durchgeführt. Dabei wurde, wie unter 2.17 dargelegt, der Kokultur ein Antikörper zugesetzt, der IL-12p70 präzipitiert, so dass es seine biologische Wirkung nicht mehr entfalten kann. Anschließend wurden im Kokulturüberstand die Zytokine IFN- γ und IL-4 sowie die lymphozytäre Proliferation gemessen.

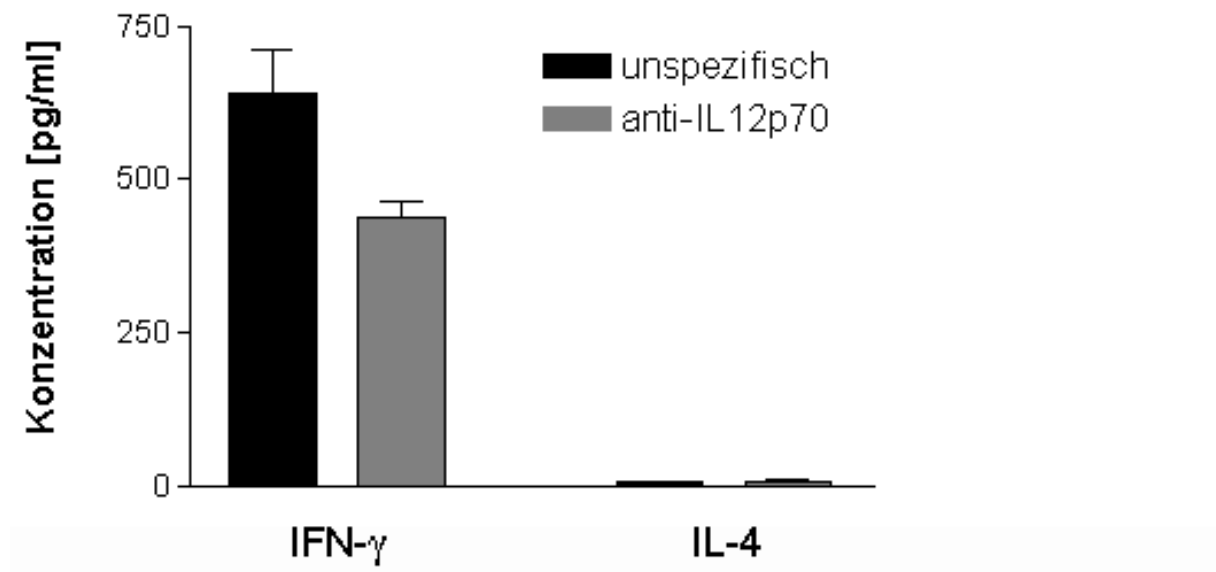


Abb. 24: IFN- γ und IL-4 Produktion im Zellkulturüberstand der Kokultur der IL-12p70 Blockierungsversuche von DC, die mit DerP1 gepulst und mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert wurden, und autologen Lymphozyten. Verglichen wird die IFN- γ und IL-4 Produktion zwischen Ansätzen, in denen ein blockierender anti-IL-12p70 Antikörper zugegeben wurde, und Ansätzen, in denen ein unspezifischer Kontrollantikörper gleichen Isotyps benutzt wurde.

Die Zugabe eines blockierenden anti-IL-12p70 Antikörpers führte zu einer Reduktion der IFN- γ Produktion um ein Drittel, während die IL-4 Produktion unbeeinflusst blieb (Abb. 24).

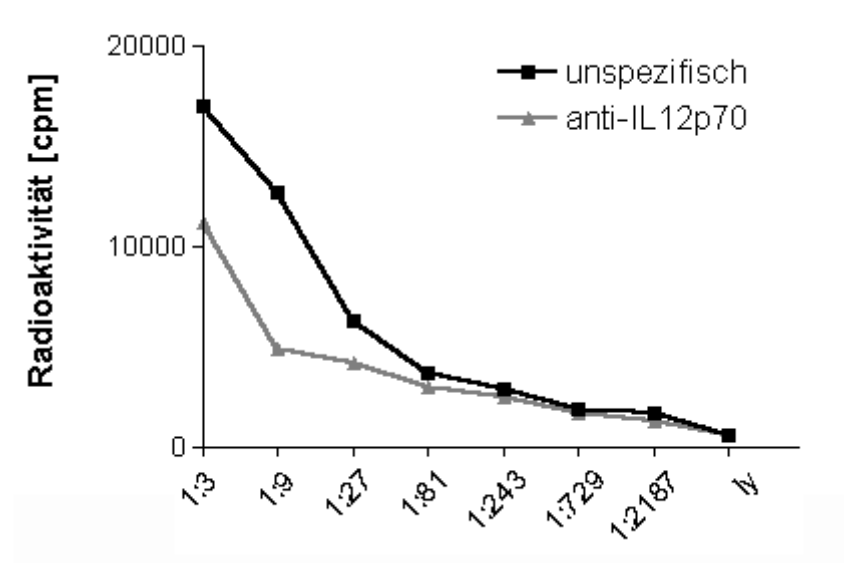


Abb. 25: Proliferation von Lymphozyten in der Kokultur der IL-12p70 Blockierungsversuche von DC, die mit DerP1 gepulst und mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert wurden, und autologen Lymphozyten. Die

Darstellung ist in Abb. 18 erklärt. Verglichen wird die Proliferation zwischen Ansätzen, in denen ein blockierender anti-IL-12p70 Antikörper zugegeben wurde, und Ansätzen, in denen ein unspezifischer Kontrollantikörper gleichen Isotyps benutzt wurde.

Die Blockierung von IL-12p70 führte zu einer Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe, der ein unspezifischer Antikörper zugesetzt wurde (Abb. 25).

Die Reduktion der IFN- γ Produktion sowie der Proliferation durch blockierende Antikörper zeigt, dass IL-12p70 auch in diesem Modell einen starken Einfluss auf die Ausbildung der T_H1-Reaktion hat.

3.6 Allergengepulste, mit MALP-2 und IFN- γ ausgereifte DC sind gegen eine 4-tägige Stimulantienauswaschphase resistent

Werden DC im Rahmen einer therapeutischen Applikation dem Patienten reinfundiert, müssen sie, um effektiv zu sein, ihre T-Zell stimulatorischen Funktionen beibehalten und dürfen nicht redifferenzieren. Ob DerP1-gepulste, MALP-2 und IFN- γ behandelte DC in ihrer Funktion arretiert sind, wurde mittels Auswasch-Experimenten überprüft. Hierbei wurden DC nach Stimulation nicht geerntet. Stattdessen wurde das komplette Zellkulturmedium abgenommen und durch frisches Medium, das nicht mit Zytokinen oder Stimulantien versehen war, ersetzt. Erst nach einer weiteren 4-tägigen Inkubationszeit erntete man die Zellen. Sie wurden, wie schon beschrieben, durchflusszytometrisch analysiert und in die Kokultur eingesetzt, wo wiederum die IFN- γ bzw. IL-4 Produktion sowie die Proliferation gemessen wurden (s. 2.18).

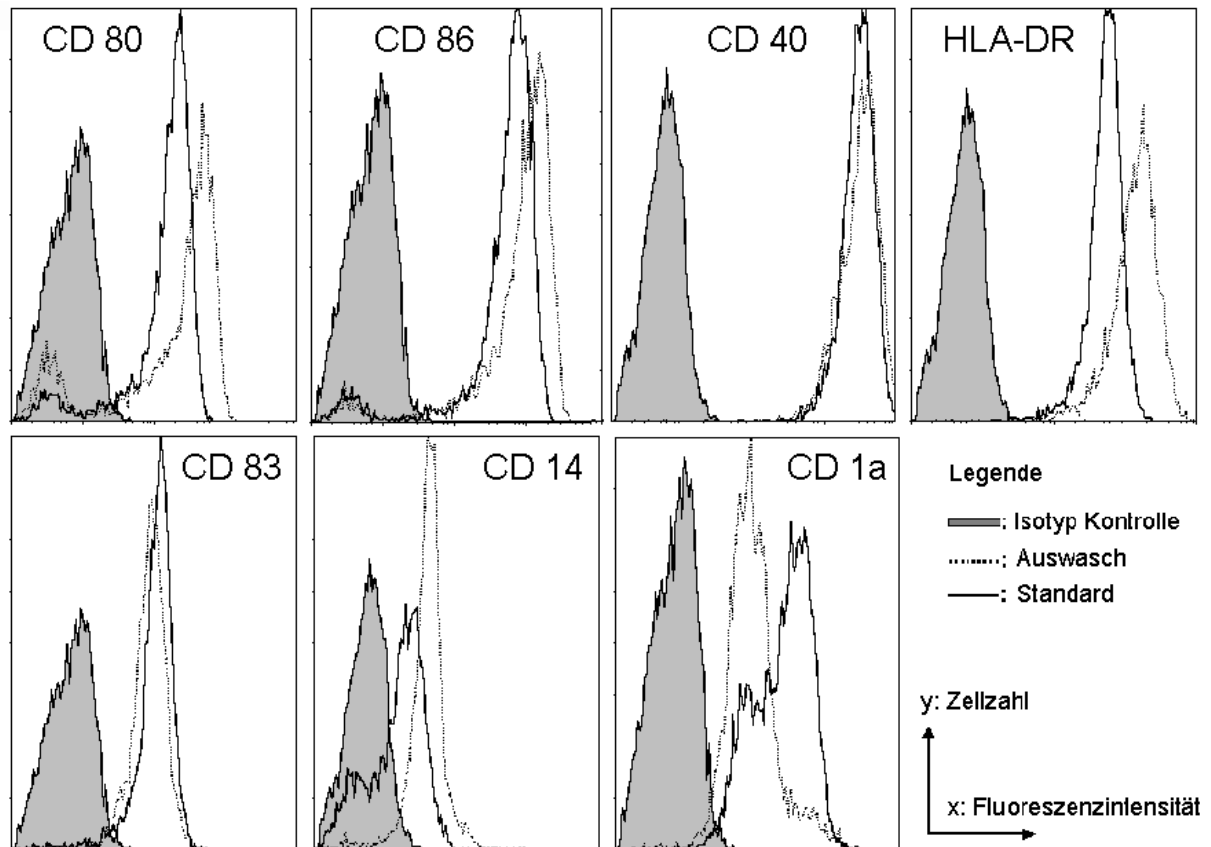


Abb. 26. Durchflusszytometrische Analyse der Auswaschversuche allergengepulster, MALP-2 und IFN- γ stimulierter DC. Verglichen werden DC, die an Tag 7 geerntet wurden (Standard) mit DC, die an Tag 7 einer 4-tägigen Auswaschperiode (Auswasch) unterworfen wurden. Die Isotypkontrolle der Auswasch-Gruppe ist grau unterlegt dargestellt. Gezeigt ist ein exemplarischer Versuchsansatz.

Während die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD 80 und CD 86 sowie HLA-DR und CD 14 durch die Auswaschphase im Vergleich zum Standardprotokoll leicht erhöht wurden, blieben CD40 und 83 unverändert. Die Expression von CD1a sank, blieb aber erhalten (Abb. 26).

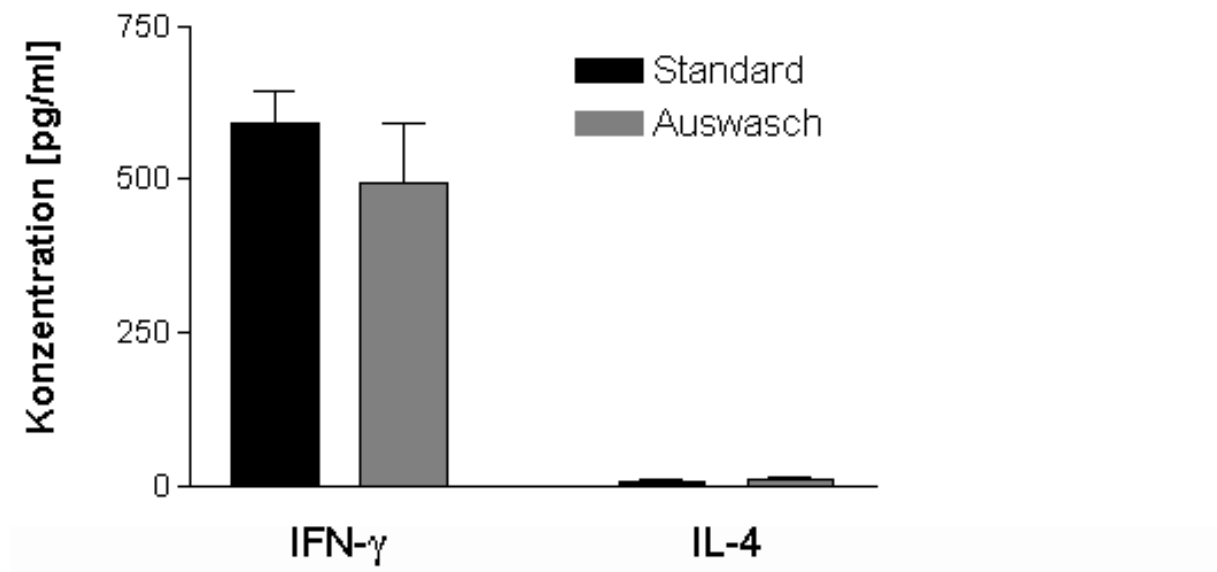


Abb. 27: IFN- γ und IL-4 Produktion im Zellkulturüberstand der Kokultur der Auswaschversuche von DC, die mit DerP1 gepulst und mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert wurden, und autologen Lymphozyten. Verglichen wird die IFN- γ und IL-4 Produktion zwischen Ansätzen, in denen DC einer 4-tägigen Auswaschphase unterworfen wurden und Ansätzen, die nach dem Standardprotokoll nach 7 Tagen geerntet wurden.

Die 4-tägige Auswaschphase reduzierte die Fähigkeit der DC, die IFN- γ Produktion in Lymphozyten zu induzieren, um ein Viertel im Vergleich zum Standardprotokoll. Die Konzentration an IL-4 blieb unverändert (Abb. 27).

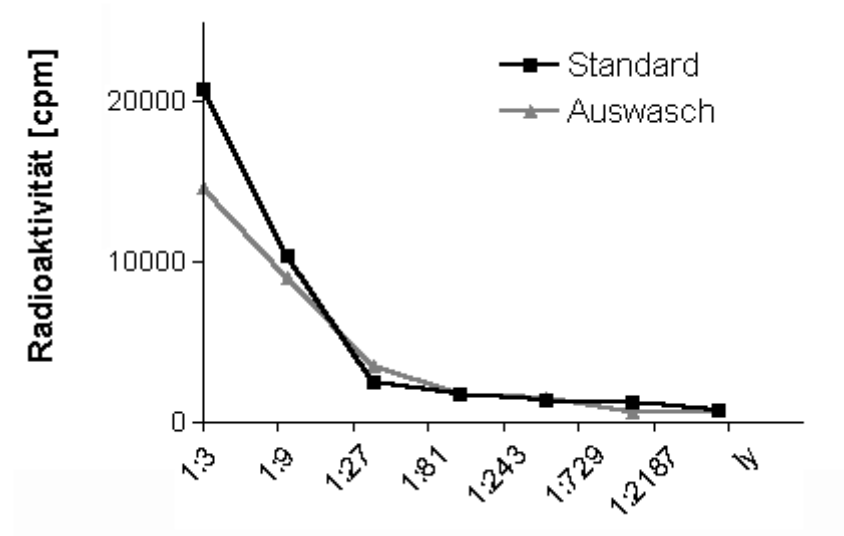


Abb. 28: Proliferation der Kokultur der Auswaschversuche von DC, die mit DerP1 gepulst und mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert wurden, und autologen Lymphozyten. Die Darstellung ist unter 18

erklärt. Verglichen wird die Proliferation zwischen Ansätzen, in denen DC einer 4-tägigen Auswaschphase unterworfen wurden und Ansätzen, die nach dem Standardprotokoll nach 7 Tagen geerntet wurden.

Die Proliferation, die durch DC nach der Auswaschphase induziert wurde, unterschied sich nur bei der höchsten Konzentration an DC von der Proliferation der nach dem Standardprotokoll behandelten Gruppe (Abb. 28).

Der Phänotyp und die Eigenschaft von DC, die mit Allergen gepulst und mit MALP-2 und IFN- γ stimuliert wurden, eine fulminante T_H1-Reaktion zu induzieren, wurden durch eine 4-tägige Stimulantienauswaschphase nur marginal beeinflusst.

4 Diskussion

DC sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Als einzige sind sie in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren (engl.: priming) (Havenith, Breedijk et al., 1993; Inaba, Metlay et al., 1990a; Inaba, Metlay et al., 1990b; Liu and MacPherson, 1993). Die Mechanismen dieser Aktivität sind die Präsentation von Antigen über Moleküle des MHC-Komplexes, die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und die Sezernierung von Zytokinen. DC stimulieren nicht nur T-Zellen, sondern sind auch an der Induktion der Art der T-Zell Antwort beteiligt. So vermögen entsprechend stimulierte DC, CD 4-positive T-Helferzellen Richtung T_H0 , T_H1 oder T_H2 zu polarisieren (Kalinski, Hilkens, et al. 1999) oder sie unter anderen Bedingungen antigenspezifisch abzuschalten (Dhodapkar and Steinman, 2002; Lambolez, Jooss et al., 2002; Liu, Iyoda et al., 2002; Martin, O'Sullivan et al., 2003). Aufgrund dieser immunregulatorischen Eigenschaften sind DC interessante Kandidaten für die zelluläre Immuntherapie. Die Idee ist, unreife DC zu isolieren, sie *ex vivo* mit therapeutisch relevantem Antigen zu beladen und anwendungsspezifisch auszureifen, um sie dann dem Patienten zu reinfundieren. Im Patienten soll so die gewünschte Immunreaktion ausgelöst werden. Erkrankungen, in denen diese Therapieform konzeptionell möglich scheint, sind Tumorerkrankungen, Allergien, Infektionen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen. Während bei Tumorerkrankungen und Infektionen durch DC eine Immunreaktion gegen antigene Komponenten von Tumoren bzw. Bakterien oder Viren unterstützt werden soll, muss sie bei Transplantatabstoßung abgeschaltet werden (Dermime, Armstrong et al., 2002; Engleman, 1996; Steinman, 1996). Therapeutisches Konzept bei allergischen Erkrankungen ist entweder ebenfalls die Abschaltung der bereits vorhandenen Immunreaktion oder die Modulation der allergischen T_H2 in eine T_H1 Reaktion (Lambrecht, Hoogsteden et al., 2001; Matsue, Kusuvara et al., 2002; Wild and Sur, 2001). Bisher ist ungeklärt, ob DC eine bereits existente allergische T_H2 Reaktion in ihrer Ausrichtung beeinflussen kann. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Behandlung von DC die allergenspezifische T_H2 Reaktion in einem *in vitro* Modell zu modulieren vermag.

4.1 Isolierung von Monozyten und Generierung von DC

DC kommen im peripheren Blut nur in sehr geringer Anzahl vor. Weniger als 1% der Leukozyten des Blutes sind DC. Dies sind zu wenig Zellen, um sie für den therapeutischen Einsatz zu nutzen. Erst seit wenigen Jahren existieren Protokolle, mit denen DC aus Vorläuferzellen in ausreichender Anzahl gewonnen werden können. Bei den Vorläuferzellen handelt es sich um CD 34 positive hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks sowie um Monozyten des Blutes. Stammzellen werden unter dem Einfluss der Zytokine GM-CSF und TNF- α in 7- bis 14-tägiger Zellkultur zu unreifen DC (Caux, Dezutter-Dambuyant et al., 1992; Inaba, Inaba et al., 1992; Siena, Di Nicola et al., 1995). Um sie zu erhalten, müssen sie erst das Knochenmark verlassen. Dazu wird den Patienten das Zytokin G-CSF verabreicht. Dies führt dazu, dass die Stammzellen mobilisiert werden und in das Blut auswandern. Dort können sie mittels Apherese gesammelt werden. Die Gabe von G-CSF ist allerdings für den Patienten belastend und schmerzhaft, zudem ist das Verfahren vergleichsweise kompliziert (Lapidot and Petit, 2002). Deswegen wurde in dieser Arbeit mit Monozyten als Ausgangspopulation gearbeitet. Sie lassen sich durch eine Vollblutentnahme gewinnen und werden durch die Zytokine GM-CSF und IL-4 in 5- bis 7-tägiger Zellkultur zu DC (Peters, Ruppert et al., 1991; Romani, Gruner et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Die Herstellung von DC aus Monozyten ist im humanen System die meistbenutzte Methode.

Die Generierung von DC sollte unter Bedingungen erfolgen, die eine schnelle Umsetzung der Ergebnisse in klinische Anwendungen erlauben. Deswegen wurde das Verfahren entsprechend den Anforderungen des Arzneimittelgesetzes und den Qualitätskriterien der guten Herstellungspraxis (GMP) optimiert. Dies bedeutet, dass nur mit für den klinischen Einsatz zugelassenen Verfahren und Substanzen gearbeitet wurde.

Zur Isolierung von Monozyten wurde zunächst eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierdurch wurden die mononukleären Zellen, Monozyten und Lymphozyten (PBMC), von den restlichen Leukozyten und den Erythrozyten abgetrennt. Für die weitere Aufreinigung der Monozyten stehen zwei zugelassene Methoden zur Wahl, die Adhärenzmethode und die Separation mittels des

CliniMACS-Systeme. Für die Adhärenz werden PBMC in Zellkulturschalen gegeben und für 1 h inkubiert. Während dieser Zeit adhären die Monozyten an der Schale, die Lymphozyten können mit dem Zellkulturmedium abgenommen werden. Durch dieses Verfahren sind Monozyten in einer Reinheit von durchschnittlich 78% zu erhalten, ein Wert weit unterhalb der technischen Möglichkeiten. Zudem war eine sehr hohe Varianz der Reinheit festzustellen. Aufgrund dieser Einschränkungen wurden die Monozyten mittels des MACS-Systems gewonnen. Hier werden Monozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation mit superparamagnetischen CD 14 Antikörper markiert und das Zellgemisch auf einer magnetischen Säule getrennt. Das benutzte MACS System unterscheidet sich von dem nach GMP zulässigem CliniMACS darin, dass es ein offenes System darstellt, in dem manuelle Pipettierschritte erforderlich sind. Das Prinzip der Separation und der benutzte Antikörper sind identisch. Exakterweise wird die Separation also unter GMP-angelegten Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde eine durchschnittliche Reinheit der Monozyten von 97% erreicht. Während die Lymphozyten für spätere Untersuchungen kryokonserviert wurden, nahm man die Monozyten in serumfreiem Medium XVIVO-15 unter dem Einfluss von 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml in Kultur. Die Konzentrationen der Zytokine lagen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Werte (Turner, Roder et al., 1999). XVIVO-15 erwies sich, bewertet anhand des Phänotyps und der Vitalität der erhaltenen DC, als das am besten geeignete Medium im Vergleich zu den anderen getesteten Medien.

Häufig wird der Zellkultur fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS) zur Verbesserung der Ausbeute und Funktionalität der DC zugesetzt. Die Benutzung von serumfreiem Medium hat zwei Nachteile: (1.) DC sind nicht vollständig ausgereift. Dies wird durch die beibehaltene Expression des Monozytenmarkers CD 14 angezeigt. Nach dem gleichen Protokoll in serumhaltigem Medium hergestellte Zellen tragen das Molekül nicht mehr (Daten nicht gezeigt). (2.) In der Kokultur von DC und autologen Lymphozyten kann die Vermehrung der Lymphozyten eingeschränkt sein. Wegen des beabsichtigten klinischen Einsatzes der Zellen wurde jedoch auf die Benutzung von FCS verzichtet: Es wurde berichtet, dass FCS eine anaphylaktische Typ I Reaktion in einem Patienten induzierte (Mackensen, Dräger et al., 2000). Des Weiteren empfiehlt sich die Benutzung von FCS aufgrund der Gefahr, xenogene Krankheiten wie BSE zu übertragen, nicht (Asher, 1999; Rolleston, 1999). Der Einsatz von syngenem Serum wie autologem oder AB Serum wird kontrovers

diskutiert. Einige Studien haben einen positiven Effekt auf Quantität und Qualität der generierten Zellen gezeigt (Cao, Verge et al., 2000; Ratta, Rondelli et al., 1998), andere jedoch beschrieben höhere phänotypische und funktionelle Varianzen des Produktes (Duperrier, Eljaafari et al., 2000). Um standardisierte und reproduzierbare Ergebnisse zu garantieren, wurde das Medium XVIVO–15 ohne den Zusatz jeglichen Serums benutzt. Dieses Vorgehen wird durch Studien unterstützt, die die Aktivierung und Proliferationsinduktion von T–Zellen durch DC im autologen serumfreien System dargestellt haben (Kondo, Cortese et al., 2001; Scheinecker, Machold et al., 1998).

4.2 Das *in vitro* Allergiemodell

DC wurden von Spendern, die gegen DerP1, das Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, allergisch sind, und von nicht–allergischen Spendern generiert. Die Zellen wurden mit dem Allergen gepulst und mit autologen Lymphozyten kokultiviert. In der Kokultur der Allergiker stellte sich eine T_H2 Immunreaktion ein, während bei gesunden Spendern keine veränderte Reaktion im Vergleich zur Kontrolle ohne DerP1 gemessen wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit jenen Studien (van den Heuvel, Vanhee et al., 1998), die die unterschiedlichen Charakteristika der DC von Gesunden und Allergikern beschreiben. Andere Studien jedoch zeigen, dass DerP1 selbst DC dazu bringt, Richtung T_H2 zu aktivieren (Ghaemmaghami, Gough et al., 2002). Diese konträre Datenlage lässt sich durch den Mechanismus der T_H2–Induktion durch DerP1 erklären: Das native Allergen besitzt enzymatische Aktivität und wirkt als Cystein Protease (Ghaemmaghami, Robins et al., 2001; Schulz, Sewell et al., 1998). Durch diese Aktivität wird die T_H2–Polarisierung gebahnt. Rekombinante Herstellung oder Aufreinigungsprozeduren ohne Schutz der reaktiven Thiol–gruppe von DerP1 bewirken die Inaktivierung des Enzyms. So ist es *per se* nicht mehr in der Lage, Richtung T_H2 zu modulieren. Diese Erklärung stützt die hier ermittelten Daten: Es wurde gezeigt, dass die Zugabe des Allergens zu DC keinen Einfluss auf die Expression von Oberflächemolekülen und die Sezernierung von Zytokinen hat. Dieser Befund steht nicht im Widerspruch zu den in der Kokultur gemessenen, sehr wohl DerP1–abhängigen Effekten bei Allergikern. Die Aminosäuresequenz wird schließlich durch den Aufreinigungsprozess nicht verändert und es ist davon

auszugehen, dass die endozytotisch aktiven DC das Allergen aufnehmen, prozessieren und über MHC-Moleküle präsentieren. Die präsentierten Peptide werden von im Blut von Allergikern vorhandenen antigenspezifischen T_H2-Zellen erkannt.

Die Kokultur wurde mit unreifen, nur allergengepulsten DC ab Tag 7 durchgeführt. Die Benutzung unreifer DC induzierte eine signifikante, aber schwache Zytokinproduktion und Proliferation der Allergiker-Lymphozyten. Eine Ausreifung der DC hätte hier stärkere Effekte hervorgebracht. Die Stimulierung von DC zur Ausreifung ist jedoch immer mit einer Beeinflussung von deren Plastizität verbunden. So würde der gemessene Effekt in der Kokultur nicht von den den Zellen innewohnenden Eigenschaften, sondern vom Ausreifungsprotokoll abhängig sein.

4.3 Stimulation mit MALP-2 und IFN- γ

4.3.1 Einfluss der Stimulation auf DC

Die gleichzeitige Stimulation von DC mit MALP-2 und IFN- γ induzierte im Vergleich zur einzelnen Gabe der Substanzen eine synergistische Hochregulierung der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD 80 und CD 86 sowie von CD 40, HLA-DR und dem Reifungsmarker CD 83 sowie eine synergistisch erhöhte Produktion von TNF- α . MALP-2 steigerte im Vergleich zur PBS Kontrolle die TNF- α und die IL-10 Produktion und hatte keinen Einfluss auf IL-12, IFN- γ alleine induzierte nur die TNF- α Produktion. Die Stimulation mit beiden Substanzen bewirkte nun die massive Induktion von IL-12, was mit der Reduktion der MALP-2 induzierten IL-10 Sezernierung einher ging.

Die Wirkung des Vorläufermoleküls von MALP-2, M161Ag bzw. M404 (Calcutt, Kim et al., 1999; Nishiguchi, Matsumoto et al., 2001), auf Monozyten abgeleitete DC wurde bereits untersucht (Nishiguchi, Matsumoto et al., 2001; Seya and Matsumoto, 2002). Neben den hier dargestellten Eigenschaften von MALP-2 ist für den Vorläufer zusätzlich die Induktion von IL-12 in DC beschrieben. Diese Eigenschaft ist für viele Applikationen aufgrund der T_H1-induzierenden Eigenschaften von IL-12 von Nutzen.

Die Anwendung von M161Ag / M404 für therapeutische Anwendungen birgt aber Nachteile: Die nur dem Vorläufer innewohnende Eigenschaft, das Komplementsystem zu aktivieren (Matsumoto, Takeda et al., 1997; Matsumoto, Yamashita et al., 1995), stellt ein potenzielles Risiko für die Induktion einer anaphylaktischen Reaktion dar. Zudem ist er im Gegensatz zu MALP-2 mit einem langen Peptidmotiv ausgestattet, das immunogene Eigenschaften aufweist. Unabhängig davon steht der Vorläufer nicht als GMP-produziertes Produkt zur Verfügung, was den routinemäßigen therapeutischen Einsatz ausschließt. Die GMP-Produktion von MALP-2 ist etabliert.

Zusätzliche Stimulierung mit IFN- γ induzierte die alleine durch MALP-2 nicht gegebene IL-12 Sezernierung. Dies steht im Einklang mit einem 2-Signal Modell, das für die Induktion dieses Moleküls vorgeschlagen wurde (Snijders, Kalinski et al., 1998). Nicht nur in dieser Arbeit ist ein Synergismus der MALP-2 und IFN- γ Stimulation beschrieben worden: Ruschmeyer et al. fanden, dass die Produktion des Cytocids Stickstoffmonoxid durch MDHDM, die ursprünglichen Bezeichnung von MALP-2, nur in strikter Anwesenheit von IFN- γ nachzuweisen war (Ruschmeyer, Thude et al., 1993).

Die durch MALP-2 und IFN- γ Stimulation erzeugten DC ließen im Vergleich zur Literatur erwarten, dass sie T-Zellen Richtung T_H1 polarisieren. Dies wurde in der Kokultur mit autologen Lymphozyten überprüft.

4.3.2 Effekt von mit MALP-2 und IFN- γ vorstimulierten DC auf autologe Lymphozyten in der Kokultur

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass DC nicht bloße Vehikel für das adaptive Immunsystem sind. Durch die Wahrnehmung von mikrobiellen Strukturmotiven (PAMP) instruieren DC das Immunsystem, wie ein potenzielles Pathogen zu bekämpfen ist. Diese Eigenschaft wird als Plastizität von DC beschrieben (Huang, Liu et al., 2001; Lanzavecchia and Sallusto, 2001; Liu, Kanzler et al., 2001). Die funktionelle Konsequenz der Plastizität ist die Induktion einer angemessenen T-Zell

Antwort. Dies kann von DC durch die Expression von antigenpräsentierenden MHC-Molekülen, von kostimulatorischen Molekülen und der Sezernierung von löslichen Mediatoren wie Zytokinen moduliert werden (Kalinski, Hilkens et al., 1999).

Die gleichen Autoren schlagen eine Hypothese vor, die besagt, dass z.B. virale Produkte wie doppelsträngige RNA oder intrazelluläre Bakterien einen DC1 Phänotyp induzieren. Dieser geht mit einer starken IL-12 Produktion einher. Nach Aktivierung naiver T-Helferzellen (T_HN) durch DC1 entstehen IFN- γ produzierende T_H1 Zellen. Andererseits induzieren Komponenten von z.B. Helminthen, wie Antigen der Eier von *Schistosoma mansoni* einen DC-2 Phänotyp charakterisiert durch eine gesenkte IL-12 Produktion und die Expression von OX40-Ligand. DC polarisieren T_HN zu IL-4 produzierende T_H2 Zellen. Andere mikrobielle Substanzen wie bakterielles LPS induzieren die Reifung von DC und lassen sie T-Zell-Reaktionen, die nicht nach dem T_H1/T_H2 Modell polarisiert sind, induzieren (T_H0). Diese DC werden als DC0 bezeichnet (Kalinski, Schuitemaker et al., 1999).

In diesem Modell kann die Wirkung der hier betrachteten Stimulantien eingeordnet werden: MALP-2 reift DC, ohne im Vergleich zur PBS-Kontrolle verstärkt IL-12 zu induzieren, und MALP-2 behandelte DC induzieren die Proliferation von Lymphozyten ohne deren Zytokinproduktion zu beeinflussen. Dies entspricht einem durch MALP-2 induzierten DC0 \rightarrow T_H0 Phänotyp. Die parallele Stimulation mit MALP-2 und IFN- γ lässt DC reifen und sie im Vergleich zu MALP-2 alleine große Mengen IL-12 produzieren. So behandelte Zellen lassen Lymphozyten proliferieren und sie IFN- γ , nicht aber IL-4, in erhöhter Konzentration produzieren. Dies entspricht einer eindeutigen DC1 \rightarrow T_H1 Reaktion.

In dieser Arbeit wurde nicht mit naiven T-Zellen, sondern mit Lymphozyten von Allergikern unter spezifischer Allergenstimulation gearbeitet. Wie beschrieben war in der Kokultur von nur allergenbeladenen DC mit den Lymphozyten auch die erwartete T_H2 -Reaktion feststellbar. Die Stimulation mit MALP-2 und IFN- γ induzierte also nicht nur eine T_H1 Reaktion, sondern war auch in der Lage, eine vorhandene T_H2 -Reaktion aufzubrechen und nach T_H1 zu überführen. Dies wird klar, da nicht das ohne Stimulation, nach Allergengabe produzierte IL-4 signifikant induziert wurde,

sondern das nach alleiniger Allergengabe unter das Detektionslimit gesunkene IFN- γ .

In einer anderen Studie wurde ebenfalls die Modulation einer vorhandenen T_H2 in eine T_H1 Reaktion beobachtet. Hier wurden DC mit Kollagen Typ I stimuliert (Brand, Bellinghausen et al., 1999). Diese Substanz hatte aber nicht nur auf DC selbst, sondern auch auf die Lymphozyten Einfluss. Sie war also auch in der Kokultur anwesend. Sollen DC therapeutisch eingesetzt werden, ist es aber notwendig, den Effekt nur von den DC selbst vermitteln zu lassen. Um tatsächlich nur DC-vermittelte Effekte auf Lymphozyten zu erfassen wurden in dieser Arbeit DC nach der Ernte gründlich gewaschen und die Kokultur in neuen Zellkulturschalen durchgeführt, um sämtliche freie Stimulantien zu entfernen.

DC können drei differenzierbare Signale an Lymphozyten geben: 1. das prozessierte Antigen über den MHC-Komplex, 2. Zell-Zellkontakt über kostimulatorische Oberflächenmoleküle und 3. lösliche Signale in Form von z.B. Zytokinen (Kalinski, Hilkens et al., 1999). Die Antigenabhängigkeit der Proliferation und die Unabhängigkeit der Zytokinproduktion in diesem System machen einen fundamentalen Unterschied zwischen beiden lymphozytären Reaktionen deutlich: Während für die Proliferation das 1. Signal, welches die Anwesenheit von Antigen erfordert, zwingend erforderlich ist, sind für Modulation der Zytokinproduktion durch MALP-2 und IFN- γ stimulierte DC die Signale 2 und 3 ausreichend. Diese These wird auch durch publizierte Daten gestützt. So beobachteten bereits Kondo et al. die antigenunabhängige Induktion von Zytokinen (Kondo, Cortese et al., 2001), während Scheinecker et al. die Aktivierung von T-Zellen durch autologe DC in Abwesenheit von Fremdanigen durch hohe Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen erklären (Scheinecker, Machold et al., 1998). Auch die hier generierten DC exprimieren diese Moleküle stark.

4.3.3 Blockierung von IL-12 in der Kokultur

Im Laufe der Diskussion wurde die Rolle von IL-12, im Besonderen der bioaktiven Form als IL12p70 Heterodimer, in der Induktion der T_H1 Immunantwort

herausgestellt. Um IL-12 Effekte in dem hier durchgeführten System zu untersuchen, wurde das Zytokin in der Kokultur von DC und autologen Lymphozyten von Allergikern durch einen präzipitierenden Antikörper blockiert. Dies hatte zur Folge, dass die IFN- γ Produktion und die Proliferation reduziert wurden, die IL-4 Konzentration blieb konstant. Ein vergleichbarer Effekt durch die IL-12 Blockierung wurde ebenfalls im allogenen System festgestellt (Heufler, Koch et al., 1996; Ohshima and Delespesse, 1997). IFN- γ Produktion und Proliferation wurden jeweils um ca. ein Drittel im Vergleich zur Kontrolle reduziert. IL-12 spielt also auch in diesem Modell eine wichtige Rolle, ist aber nicht allein verantwortlich für die gemessenen Effekte. Die verbleibende Aktivität kann durch kompensatorische Mediatoren sowie durch andere Mechanismen wie z.B. direkten Zell-Zell-Kontakt erklärt werden.

4.3.4 Auswaschung von Stimulantien

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation von DC mit MALP-2 und IFN- γ eine massive T_H1 Immunantwort induziert. Für einige Stimulationsprotokolle ist jedoch die Redifferenzierung der Zellen vom reifen zum unreifen Phänotyp nach Entzug der Stimulantien beschrieben. Für die klinische Anwendung ist aber von besonderer Wichtigkeit, dass die behandelten Zellen ihre gewonnenen Eigenschaften nach Reinfusion beibehalten (Romani, Reider et al., 1996; Thurner, Roder et al., 1999). Mittels einer Auswaschphase, in der die DC nach Stimulation in Abwesenheit aller Stimulantien weiterkultiviert wurden, sollte die Stabilität des Phänotyps untersucht werden. Mit MALP-2 und IFN- γ behandelte DC behielten die Expression ihrer Oberflächenmoleküle sowie ihr lymphozyten-stimulatorisches Potenzial während einer 4-tägigen Auswaschperiode bei. Deswegen können so behandelte DC als voll ausgereift und stabil bezeichnet werden. Sie sind bezüglich dieser Parameter gut für die klinische Anwendung geeignet.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden DC nach einem Protokoll generiert, das sich leicht für die klinische Anwendung adaptieren läßt. Des Weiteren wurde ein Stimulationsprotokoll etabliert, das DC in die Lage versetzt, eine exakt reproduzierbare T_H1 Immunreaktion zu induzieren und eine vorhandene T_H2 -Reaktion in eine T_H1 -Reaktion zu modulieren. Daraus ergeben sich zwei Indikationsfelder: die Tumorthherapie, für die die Induktion einer tumorspezifischen T_H1 -Reaktion das Ziel ist, und die Allergie, für die die Modifikation der vorhandenen T_H2 -Reaktion angezeigt ist. Der Einsatz von MALP-2 und $IFN-\gamma$ stimulierten DC für diese Applikationen ist zum Patent angemeldet worden.

Bisher existieren keine klinischen Untersuchungen zum Einsatz von DC bei Allergien. Deshalb sollen für dieses Indikationsgebiet zuerst die *in vivo* Wirksamkeit der DC im Rahmen eines SCID-Mausmodells des allergischen Asthma bronchiale gezeigt werden. SCID-Mäuse sind u.a. durch das Fehlen des adaptiven Immunsystems gekennzeichnet. Daher akzeptieren die Tiere Allo- und Xenotransplantate. Das SCID-Modell des Asthma beruht auf der Rekonstitution des Immunsystems mit DC und Lymphozyten von Allergikern. Dabei werden allergengepulste DC intratracheal in die Lunge instilliert. Die Ausbildung einer allergischen Entzündung kommt dann nach inhalativer Allergenaerosolprovokation zustande (Hammad, Lambrecht et al., 2002). In diesem Modell soll die Effektivität der behandelten DC untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2(8), 675-680. 2001.
2. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406(6793), 309-314. 2000.
3. Asher, D. M. Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev.Biol.Stand.* 99, 41-44. 1999.
4. Austyn, J. M. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 183(4), 1287-1292. 1996.
5. Barton, G. M. and Medzhitov, R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 14(3), 380-383. 2002.
6. Bernhard, H., Disis, M. L., Heimfeld, S., Hand, S., Gralow, J. R., and Cheever, M. A. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res.* 55(5), 1099-1104. 1995.
7. Brand, U., Bellinghausen, I., Enk, A. H., Jonuleit, H., Becker, D., Knop, J., and Saloga, J. Allergen-specific immune deviation from a TH2 to a TH1 response induced by dendritic cells and collagen type I. *J Allergy Clin Immunol* 104(5), 1052-1059. 1999.
8. Busse, W. W. and Lemanske, R. F., Jr. Asthma. *N.Engl.J.Med.* 344(5), 350-362. 2001.
9. Calcutt, M. J., Kim, M. F., Karpas, A. B., Muhlradt, P. F., and Wise, K. S. Differential posttranslational processing confers intraspecies variation of

- a major surface lipoprotein and a macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans*. *Infect.Immun.* 67(2), 760-771. 1999.
10. Cao, H., Verge, V., Baron, C., Martinache, C., Leon, A., Scholl, S., Gorin, N. C., Salamero, J., Assari, S., Bernard, J., and Lopez, M. In vitro generation of dendritic cells from human blood monocytes in experimental conditions compatible for in vivo cell therapy. *J Hematother.Stem Cell Res.* 9(2), 183-194. 2000.
 11. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360(6401), 258-261. 1992.
 12. Chan, V. W., Kothakota, S., Rohan, M. C., Panganiban-Lustan, L., Gardner, J. P., Wachowicz, M. S., Winter, J. A., and Williams, L. T. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93(11), 3610-3616. 1999.
 13. Comoy, E. E., Pestel, J., Duez, C., Stewart, G. A., Vendeville, C., Fournier, C., Finkelman, F., Capron, A., and Thyphronitis, G. The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma. *J.Immunol.* 160(5), 2456-2462. 1998.
 14. Dermime, S., Armstrong, A., Hawkins, R. E., and Stern, P. L. Cancer vaccines and immunotherapy. *Br.Med Bull.* 62:149-62., 149-162. 2002.
 15. Dhodapkar, M. V. and Steinman, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100(1), 174-177. 2002.
 16. Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J.Leukoc.Biol.* 66(2), 252-262. 1999.
 17. Duperrier, K., Eljaafari, A., Dezutter-Dambuyant, C., Bardin, C., Jacquet, C., Yoneda, K., Schmitt, D., Gebuhrer, L., and Rigal, D. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from

- monocytes, in the presence of different serum supplements. *J Immunol.Methods* 238(1-2), 119-131. 2000.
18. Engleman, E. G. Dendritic cells in the treatment of cancer. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2(3), 115-117. 1996.
19. Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99(1), 23-33. 1999.
20. Ghaemmamghami, A. M., Gough, L., Sewell, H. F., and Shakib, F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clin Exp Allergy* 32(10), 1468-1475. 2002.
21. Ghaemmamghami, A. M., Robins, A., Gough, L., Sewell, H. F., and Shakib, F. Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN-gamma. *Eur.J.Immunol.* 31(4), 1211-1216. 2001.
22. Gough, L., Schulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J.Exp.Med.* 190(12), 1897-1902. 1999.
23. Granucci, F., Ferrero, E., Foti, M., Aggujaro, D., Vettoretto, K., and Ricciardi-Castagnoli, P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes.Infect.* 1(13), 1079-1084. 1999.
24. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20, 621-667. 2002.
25. Hammad, H., Lambrecht, B. N., Pochard, P., Gosset, P., Marquillies, P., Tonnel, A. B., and Pestel, J. Monocyte-derived dendritic cells induce a

- house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J.Immunol.* 169(3), 1524-1534. 2002.
26. Havenith, C. E., Breedijk, A. J., Betjes, M. G., Calame, W., Beelen, R. H., and Hoefsmit, E. C. T cell priming in situ by intratracheally instilled antigen-pulsed dendritic cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 8(3), 319-324. 1993.
27. Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., and Schuler, G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur.J.Immunol.* 26(3), 659-668. 1996.
28. Hoefsmit, E. C. Macrophages, Langerhans cells, interdigitating and dendritic accessory cells: a summary. *Adv.Exp.Med.Biol.* 149, 463-468. 1982.
29. Holla, A. D., Roy, S. R., and Liu, A. H. Endotoxin, atopy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2(2), 141-145. 2002.
30. Huang, F. P. and MacPherson, G. G. Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance. *Curr.Mol.Med.* 1(4), 457-468. 2001.
31. Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294(5543), 870-875. 2001.
32. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 176(6), 1693-1702. 1992.
33. Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., and Steinman, R. M. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J.Exp.Med.* 172(2), 631-640. 1990b.

34. Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int.Rev.Immunol.* 6(2-3), 197-206. 1990a.
35. Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 31(11), 3388-3393. 2001.
36. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med.* 194(6), 863-869. 2001.
37. Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20(12), 561-567. 1999.
38. Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol.* 162(6), 3231-3236. 1999.
39. Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandering, K. P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., and Martin, R. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat.Immunol.* . 2001.
40. Koski, G. K., Lyakh, L. A., Cohen, P. A., and Rice, N. R. CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB. *Crit Rev.Immunol.* 21(1-3), 179-189. 2001.
41. Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engemann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40

- ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur.J.Immunol.* 31(10), 3026-3037. 2001.
42. Lambolez, F., Jooss, K., Vasseur, F., and Sarukhan, A. Tolerance induction to self antigens by peripheral dendritic cells. *Eur J Immunol* 32(9), 2588-2597. 2002.
43. Lambrecht, B. N., Hoogsteden, H. C., and Pauwels, R. A. Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. *Int.Arch Allergy Immunol* 124(4), 432-446. 2001.
44. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr.Opin.Immunol.* 13(3), 291-298. 2001.
45. Lapidot, T. and Petit, I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 30(9), 973-981. 2002.
46. Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R. M. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 196(8), 1091-1097. 2002.
47. Liu, L. M. and MacPherson, G. G. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J.Exp.Med.* 177(5), 1299-1307. 1993.
48. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat.Immunol.* 2(7), 585-589. 2001.
49. Mackensen, A., Drager, R., Schlesier, M., Mertelsmann, R., and Lindemann, A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 49(3), 152-156. 2000.
50. Marten, A., Flieger, D., Renoth, S., Weineck, S., Albers, P., Compes, M., Schottker, B., Ziske, C., Engelhart, S., Hanfland, P., Krizek, L., Faber,

- C., von Ruecker, A., Muller, S., Sauerbruch, T., and Schmidt-Wolf, I. G. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother.* 51(11-12), 637-644. 2002.
51. Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18(1), 155-167. 2003.
52. Matsue, H., Kusuhaara, M., Matsue, K., and Takashima, A. Dendritic cell-based immunoregulatory strategies. *Int.Arch Allergy Immunol* 127(4), 251-258. 2002.
53. Matsumoto, M., Takeda, J., Inoue, N., Hara, T., Hatanaka, M., Takahashi, K., Nagasawa, S., Akedo, H., and Seya, T. A novel protein that participates in nonself discrimination of malignant cells by homologous complement. *Nat.Med.* 3(11), 1266-1270. 1997.
54. Matsumoto, M., Yamashita, F., Iida, K., Tomita, M., and Seya, T. Purification and characterization of a human membrane protein that activates the alternative complement pathway and allows the deposition of homologous complement C3. *J.Exp.Med.* 181(1), 115-125. 1995.
55. McLellan, A. D., Starling, G. C., and Hart, D. N. Isolation of human blood dendritic cells by discontinuous Nycodenz gradient centrifugation. *J.Immunol.Methods* 184(1), 81-89. 1995.
56. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol.* 1(2), 135-145. 2001.
57. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640), 394-397. 1997.

58. Meierhoff, G., Krause, S. W., and Andreesen, R. Comparative analysis of dendritic cells derived from blood monocytes or CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Immunobiology* 198(5), 501-513. 1998.
59. Morr, M., Takeuchi, O., Akira, S., Simon, M. M., and Muhlradt, P. F. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur.J.Immunol.* 32(12), 3337-3347. 2002.
60. Muhlradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R., and Jung, G. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J.Exp.Med.* 185(11), 1951-1958. 1997.
61. Muhlradt, P. F. and Schade, U. MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect.Immun.* 59(11), 3969-3974. 1991.
62. Nishiguchi, M., Matsumoto, M., Takao, T., Hoshino, M., Shimonishi, Y., Tsuji, S., Begum, N. A., Takeuchi, O., Akira, S., Toyoshima, K., and Seya, T. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J.Immunol.* 166(4), 2610-2616. 2001.
63. Ohshima, Y. and Delespesse, G. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J.Immunol.* 158(2), 629-636. 1997.
64. Pauwels, R. A., Brusselle, G. J., and Kips, J. C. Cytokine manipulation in animal models of asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156(4 Pt 2), S78-S81. 1997.
65. Peters, J. H., Ruppert, J., Gieseler, R. K., Najjar, H. M., and Xu, H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology* 59(3), 122-126. 1991.

66. Ratta, M., Rondelli, D., Fortuna, A., Curti, A., Fogli, M., Fagnoni, F., Martinelli, G., Terragna, C., Tura, S., and Lemoli, R. M. Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34 cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells. *Br.J Haematol.* 101(4), 756-765. 1998.
67. Robinson, D. S. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br.Med.Bull.* 56(4), 956-968. 2000.
68. Rolleston, W. B. Bovine serum: reducing the variables through the use of donor herds. *Dev.Biol.Stand.* 99, 79-86. 1999.
69. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J.Exp.Med.* 180(1), 83-93. 1994.
70. Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J.Immunol.Methods* 196(2), 137-151. 1996.
71. Ruschmeyer, D., Thude, H., and Muhlradt, P. F. MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 7(3), 223-229. 1993.
72. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179(4), 1109-1118. 1994.
73. Santiago-Schwarz, F. Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J.Leukoc.Biol.* 66(2), 209-216. 1999.
74. Scheinecker, C., Machold, K. P., Majdic, O., Hocker, P., Knapp, W., and Smolen, J. S. Initiation of the autologous mixed lymphocyte reaction

- requires the expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol.* 161(8), 3966-3973. 1998.
75. Schulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J.Exp.Med.* 187(2), 271-275. 1998.
76. Seya, T. and Matsumoto, M. A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 34(8), 901-906. 2002.
77. Siena, S., Di Nicola, M., Bregni, M., Mortarini, R., Anichini, A., Lombardi, L., Ravagnani, F., Parmiani, G., and Gianni, A. M. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp.Hematol.* 23(14), 1463-1471. 1995.
78. Smithers, M., O'Connell, K., MacFadyen, S., Chambers, M., Greenwood, K., Boyce, A., Abdul-Jabbar, I., Barker, K., Grimmett, K., Walpole, E., and Thomas, R. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 52(1), 41-52. 2003.
79. Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int.Immunol.* 10(11), 1593-1598. 1998.
80. Steinman, R. M. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol.* 24(8), 859-862. 1996.
81. Stingl, G. Dendritic cells of the skin. *Dermatol.Clin.* 8(4), 673-679. 1990.
82. Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating

- lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 164(2), 554-557. 2000.
83. Thery, C. and Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr.Opin.Immunol.* 13(1), 45-51. 2001.
84. Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A., and Schuler, G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J.Immunol.Methods* 223(1), 1-15. 1999.
85. Tjoa, B. A., Lodge, P. A., Salgaller, M. L., Boynton, A. L., and Murphy, G. P. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin* 49(2), 117-28, 65. 1999.
86. van den Heuvel, M. M., Vanhee, D. D., Postmus, P. E., Hoefsmit, E. C., and Beelen, R. H. Functional and phenotypic differences of monocyte-derived dendritic cells from allergic and nonallergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 101(1 Pt 1), 90-95. 1998.
87. Wild, J. S. and Sur, S. CpG oligonucleotide modulation of allergic inflammation. *Allergy* 56(5), 365-376. 2001.
88. Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C. L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1(1), 69-75. 2001.
89. Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., and van Ree, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296(5567), 490-494. 2002.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1a: Ficoll–Paque Dichtegradient vor Zentrifugation	27
Abb. 1b: Ficoll–Paque Dichtegradient nach Zentrifugation	27
Abb. 2: Zeitstrahl der Versuchsdurchführung	32
Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC, CD 14 – negativer und CD 14 – positiver Fraktion	40
Abb. 4: Expression von funktionell relevanten Oberflächenmolekülen nach 7-tägiger Inkubation von Monozyten unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 in den angegebenen Medien	42
Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse von DC nach Dextran–FITC Inkubation ..	43
Abb. 6: Mikroskopische Aufnahme von DC nach Dextran–FITC Inkubation.....	44
Abb. 7: Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-4 in der Kokultur von autologen Lymphozyten mit Allergengepulsten bzw. ungepulste DC	46
Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse der CD 80 Expression von DC.....	48
Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der CD 86 Expression von DC.....	49
Abb. 10: Durchflusszytometrische Analyse der CD 40 Expression von DC.....	50
Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der HLA–DR Expression von DC.....	51
Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der CD 83 Expression von DC.....	52
Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der CD 14 Expression von DC.....	53
Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der CD 1a Expression von DC.....	54
Abb. 15: Sezernierung von IL-10 durch DC	55
Abb. 16: Sezernierung von IL-12p70 durch DC	56
Abb. 17: Sezernierung von TNF- α durch DC	57
Abb. 18: Proliferation in der Kokultur in Abhängigkeit vom Allergen.....	59
Abb. 19: Vergleich der Proliferationsabhängigkeit von den Stimulationsprotokollen.....	60
Abb. 20: Produktion von IFN- γ in der Kokultur	61
Abb. 21: Produktion von IL-4 in der Kokultur	62
Abb. 22: Logarithmische Darstellung der Verhältnisse von IFN- γ zu IL-4.....	63
Abb. 23: Frequenz IFN- γ produzierender Lymphozyten in der Kokultur.....	64
Abb. 24: IFN- γ und IL-4 Produktion im Zellkulturüberstand der Kokultur der IL-12p70 Blockierungsversuche.....	66
Abb. 25: Proliferation von Lymphozyten in der Kokultur der IL-12p70 Blockierungsversuche.....	66
Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse der Auswaschversuche.....	68
Abb. 27: IFN- γ und IL-4 Produktion im Zellkulturüberstand der Kokultur der Auswaschversuche.....	69
Abb. 28: Proliferation der Kokultur der Auswaschversuche	69

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis der benutzten Antikörper	24
Tabelle 2: Untersuchungsgruppen.....	30
Tabelle 3: Ansätze der durchflusszytometrischen Messung	33
Tabelle 4: Vergleich der Zellzahlen und der Zellvitalitäten.....	42

8 Publikationsliste

Zeitschriftenbeiträge:

1. **H. Weigt**, P.F. Muhlradt, A. Emmendorffer, N. Krug, A. Braun; Synthetic Mycoplasma-Derived Lipopeptide MALP-2 Induces Maturation and Function of Dendritic Cells; Immunobiology; im Druck
2. **H. Weigt**, P.F. Muhlradt, A. Emmendorffer, N. Krug, A. Braun; MALP-2 and IFN- γ Stimulation Modulate the Dendritic Cell Induced T_H2-Reaction to T_H1 in an *in vitro* allergy model; Eingereicht

Patentschrift:

H. Weigt, P.F. Muhlradt, N. Krug, A. Braun; Modulation dendritischer Zellen durch Bisacyloxypropylcystein-Konjugate; zum Patent angemeldet

Vorträge:

1. **H. Weigt**; MALP-2 und dendritische Zellen - Interaktion mit Lymphozyten; Workshop „MALP und seine potentielle Wirkung in verschiedenen Tumormodellen“; GBF Braunschweig; 25.11.2001
2. **H. Weigt**; MALP-2 induziert die Reifung von dendritischen Zellen; Workshop „Dendritische Zellen – Vorstellung von Arbeitsgruppen aus Hannover“; MH Hannover; 06.12.2002

Kongressbeiträge:

1. Müller, M., **Weigt, H.**, Bälder, R., Emmendorffer, A., Freihost, J.; Einfluß einer RSV-Infektion auf die Interaktion zwischen Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen - Untersuchungen in einem Kokulturmodell; 40. Kongreß der

Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und 25. Kongreß der Öglut; Bad Reichenhall/Salzburg, Österreich; 17.-20.03.1999

2. **Weigt, H.**, Müller, M., Böker, T., Kniep, E., Emmendorffer, A.; Immunomodulatory activity of polysaccharides derived from plant bacteria; 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie; Hannover; 29.9.-02.10.1999
3. Müller, M., **Weigt, H.**, Bälder, R., Freiherst, J., Emmendorffer, A.; Influence of respiratory syncytial virus infection on the interaction of lung epithelial cells and alveolar macrophages; 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie; Hannover; 29.9.-2.10.1999
4. **H. Weigt**, A. Emmendorffer, N. Krug, A. Braun; The Mycoplasmal Lipopeptide MALP-2 improves Maturation and Function of Dendritic Cells; Euroconference on the interactions between innate and adaptive immunity in mammalian defense against bacterial infections; Göhren-Lebbin; 05.-08.06.2002
5. **H. Weigt**, A. Emmendorffer, N. Krug, A. Braun; The Mycoplasmal Lipopeptide MALP-2 improves Maturation and Function of Dendritic Cells; 7th International Symposium on Dendritic Cells; Bamberg; 19.-24.09.2002
6. **H. Weigt**, N. Krug, A. Braun; A Dendritic Cell Based Test System To Evaluate The Modulatory Potential Of Drugs On Allergic Immunoreaction; Dendritic Cells: Interfaces with Immunobiology and Medicine; Keystone, USA; 03.-08.03.2003
7. **H. Weigt**, N. Krug, A. Braun; A Dendritic Cell Based Test System To Evaluate The Modulatory Potential Of Drugs On Allergic Immunoreaction; 60th Annual Meeting, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; Denver, USA; 19.-23.03.2003

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Henning Weigt

Hannover, 2.April.2003

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Andreas Emmendorffer für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung auch über räumliche Distanz hinweg sowie die Übernahme des Hauptreferates bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Norbert Krug danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Bereich Immunologie / Allergologie und Klinische Inhalation des Fraunhofer ITEM zu Ende führen zu können, sowie für fachliche Unterstützung und richtungsweisende Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Armin Braun, Leiter der Arbeitsgruppe Immunologie / Allergologie des Fraunhofer ITEM. Durch seine Förderung in fachlichen und persönlichen Belangen, auch im Laboralltag, konnte diese Arbeit mit Erfolg abgeschlossen werden.

Für die Unterstützung bei der Probandenrekrutierung danke ich Frau Bettina Lanver und Herrn Dr. Michael Larbig sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Klinische Allergie-, Asthma- und Inhalationsforschung des Fraunhofer ITEM.

Herrn Prof. Dr. Peter F. Mühradt und der Arbeitsgruppe Wundheilung aus dem Gründerzentrum Braunschweig danke ich für die gute Kooperation und für die Überlassung von MALP-2.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie und Allergologie sowie den Mitarbeiterinnen der Firma KITARO Biotech danke ich im Speziellen. Nicht zuletzt die gute, unkomplizierte Atmosphäre hat mich dazu bewogen, die Doktorarbeit in dieser Gruppe durchzuführen.

Den Wichtigsten Einfluss auf das Gelingen dieser Arbeit hatte meine Familie: Meine Eltern und Großeltern, Yogi, Anne sowie Familie Kollenrott. Herzlichen Dank für Eure Geduld und Unterstützung in sämtlichen Belangen!

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Familienstand:	ledig	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Geburtstag:	25.05.1974	
Geburtsort	Hameln	
Eltern:	Weigt, Hans-Herbert	Geburtstag: 07.03.1951
	Weigt, Gisela, geb. Schunke	Geburtstag: 30.10.1954

Schulbildung:

Grundschule:	Grundschule Klein Berkel	1980-1984
Orientierungsstufe:	OS Nord, Hameln	1984-1985
Gymnasium:	Albert-Einstein-Gymnasium, Hameln	1986-1993
Abschluß:	Abitur im Sommer 1993	

Ersatzdienst:

Zivildienst: Paritätische Gesellschaft Behindertenhilfe, Werkstatt Hameln II
01.09.1993-30.11.1994

Studium:

Zeitraum:	WS 1994-SS 1999
Studienort:	Universität Hannover
Fach:	Biologie
Art:	Diplomstudiengang
	Diplomarbeit: „Immuntoxikologische Charakterisierung der Wirkung von Polysacchariden aus Pflanzen, pflanzlicher Zellkultur und phyto-kommensalen Bakterien auf das Makrophagensystem“ angefertigt am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover
Abschluß:	Diplomprüfungen bestanden am 19.07.1999

Beruflicher Werdegang:

Wissenschaftliche Hilfskraft:	01.10.1999-31.09.2000
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover	
Wissenschaftlicher Mitarbeiter zu Promotion:	01.10.2000-31.09-2002
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover	
Wissenschaftlicher Mitarbeiter:	seit 01.10.2002
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin, Hannover	